



Mariana Martins Cândido

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Estudo da erosão dentária provocada pelo
consumo de Coca-Cola® utilizando
espectroscopia Raman e de Fluorescência de
Raios-X**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Professora Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa
Moreno, Professora Auxiliar Convidada, FCT-UNL
Co-orientador: Professor Doutor João Miguel Lourenço Silveira, Pro-
fessor Auxiliar, GIBBO-FMDUL

Júri

Presidente: Doutora Carla Quintão Pereira
Arguente: Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques
Vogal: Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017

Estudo da erosão dentária provocada pelo consumo de Coca-Cola® utilizando espectroscopia Raman e de Fluorescência de Raios-X

Copyright © Mariana Martins Cândido, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Para os meus queridos pais.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Sofia Pessanha, pela constante simpatia e amabilidade demonstradas desde o primeiro dia. Pelos ensinamentos e partilha de conhecimentos fundamentais para a realização deste trabalho e crescimento enquanto estudante. Por toda a paciência e disponibilidade a qualquer hora do dia, e pela confiança depositada em mim, o meu sincero obrigada.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor João Silveira, por toda a ajuda e ensinamentos de Medicina Dentária imprescindíveis à realização do trabalho e pela constante boa disposição e apoio, um muito obrigada.

Ao Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física das Radiações (LibPhys) da FCT-UNL, que foi a minha "sala de aula" ao longo dos últimos meses, e aos seus docentes, em especial à Professora Doutora Maria Luísa de Carvalho e ao Professor Doutor Mauro Guerra pela ajuda na integração no laboratório e disponibilidade para ajudar em qualquer situação. Ao Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral (GIBBO) da FMDUL por todas as condições e materiais disponibilizados para a realização deste estudo, e a todos os seus colaboradores, alunos e professores, por me terem recebido sempre tão bem.

Aos meus colegas de laboratório e principalmente amigos: Gonçalo Luís, Tânia Liu, Marta Palma, Tiago Mateus e Mariana Monteiro, por serem os melhores colegas de laboratório que me podiam ter calhado. Por ajudarem a tornar o difícil quase fácil com a vossa constante motivação, bom ambiente de trabalho e entre-ajuda ao longo desta caminhada. Sem vocês não teria sido a mesma coisa.

À Alexandra Martins, a minha *sister from another mister* com a qual sei que poderei sempre contar. Obrigada por estares sempre lá para me abrir a porta de casa, mesmo quando chego sem aviso prévio.

À Ana Fouto, por ser um grande exemplo de resiliência e otimismo ao longo destes 5 anos. Obrigada por tudo o que me ensinaste, e que levo comigo para o resto da vida.

Às minhas *due ragazze*, Cristina Palma e Inês Barros, por terem feito parte de uma das melhores experiências que tive até hoje. Obrigada pelas guerras de estendal, ovos partidos e pelas mil e uma aventuras que fizeram de Milão uma segunda casa e de vocês uma segunda família.

Não podia deixar de mencionar os meus amigos João Crastes, Sara Dias, Miguel Duarte, Gonçalo Costa, Filipa Lopes, Sofia Gouveia, Margarida Silva, Pedro Costa, Ana Leonor, Leonor Inverno, Marta Barbas, Paula Martins, David Melo e Miguel Baptista por, desde o início, serem um *background* constante de companheirismo e entre-ajuda, tanto em noites de estudo como de festa. Hoje sei que não me poderiam ter calhado melhores.

À Mariana Marques, Ana Filipa Duarte e Inês Ramalho às quais agradeço a amizade incondicional e todo o apoio sempre demonstrado.

Ao Miguel Cândido, meu irmão e primeiro amigo, por ser o chato com o qual já não sei passar sem, pelas inúmeras piadas que animam os meus dias e por me ensinar mais do que pode imaginar.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais, Cristina e José Cândido, por todos os valores e ensinamentos transmitidos, por me apoiarem incondicionalmente e pelo exemplo que sempre foram e continuam a ser. Por terem permitido que chegasse até aqui, sempre com liberdade para traçar o meu próprio percurso e acreditando que sou capaz de tudo, por vezes mais que eu própria. Obrigada por serem o meu porto seguro e por saber que caberei sempre no vosso colo, por mais que os anos passem.

Resumo

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar as alterações no conteúdo elementar mineral do esmalte de espécimes dentários submetidos à ação da Coca-Cola®, marca de refrigerante mundialmente conhecida e consumida. Para tal foram utilizados espécimes de esmalte dentário humano recolhidos no banco de dentes do Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (GIBBO-LibPhys da FMDUL), que foram subdivididos em 4 grupos: 2 para estudos *self-control* (grupos *T* e *S*) e um grupo controlo ($A_1 - E_1$) e respetivo grupo experimental ($A_2 - E_2$). Esta subdivisão teve por base o tipo de estudo pretendido: estudo da desmineralização em profundidade e/ou em superfície, e técnica analítica utilizada: Fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF) e/ou Raman confocal. Para o grupo *T* as medições foram realizadas em superfície e perfil, no grupo *S* apenas em superfície, enquanto que para o grupo *A - E* apenas em perfil. As medições em perfil tiveram a finalidade de determinar a profundidade da desmineralização. Todos os grupos de espécimes foram submetidos ao mesmo protocolo de ciclos erosivos, correspondendo a 3 tomas diárias de Coca-Cola®, durante um período de 10 dias. Entre ciclos e durante a noite os espécimes foram conservados em saliva artificial.

Os resultados obtidos revelaram desmineralização dentária tanto nas análises em superfície como nas análises em perfil. Nas análises em superfície observou-se uma ligeira diminuição da concentração (w/w%) em Ca e P e um aumento aparente da concentração dos elementos traço Sr e S, obtido por μ -EDXRF. Aliado aos resultados anteriores, o aumento da razão de despolarização observado nas medições por μ -Raman foi também indicativo de desmineralização em superfície. Adicionalmente, as análises em perfil revelaram uma profundidade de desmineralização na ordem das dezenas de μm , tanto nas medições por μ -EDXRF como por μ -Raman confocal. Os resultados demonstraram que a técnica de μ -Raman confocal é mais sensível para avaliar a desmineralização dentária.

Palavras-chave: desmineralização dentária, esmalte dentário, espectroscopia por Fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF), espectroscopia μ -Raman confocal.

Abstract

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the changes in the mineral content of enamel specimens submitted to the action of a world-widely consumed soft drink, Coca-Cola®. For this purpose, human dental enamel specimens were collected from the teeth bank of the Research Group in Biology and Oral Biochemistry of the Faculty of Dentistry of the University of Lisbon (GIBBO-LibPhys FMDUL), which were subdivided into four groups: 2 of them for self-control studies (groups *T* and *S*) and a control group ($A_1 - E_1$) and respective experimental group ($A_2 - E_2$). This subdivision was based on the type of study intended: study of demineralization in depth and/or surface, and analytical technique performed: energy dispersive X-ray fluorescence EDXRF and/or confocal Raman. *T* group specimens were analysed on the surface and cross section, for group *S* the measurements were made only to the surface, while for *A - E* group were performed only on the cross section. Cross section measurements were performed to determine the depth of demineralization. All specimens were submitted to the same erosive challenge protocol, corresponding to the consumption of 3 daily doses of Coca-Cola®, during a period of 10 days. Between cycles and overnight the specimens were stored in artificial saliva.

The results revealed dental demineralization both in surface analysis and in cross section analysis. Surface analysis showed a slight decrease in the concentration (w/w%) of Ca e P and an apparent increase in the concentration of trace elements Sr and S, obtained by μ -EDXRF. In addition to the above results, the increase in the depolarization ratio observed in the measurements performed by μ -Raman was also indicative of surface demineralization. Furthermore, both profile analysis performed revealed a demineralization depth of tens of μm . The results suggest that μ -Raman technique is more sensitive to assessing dental demineralization.

Keywords: dental demineralization, enamel, energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (EDXRF), confocal μ -Raman spectroscopy.

Índice

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Acrónimos e Siglas	xxiii
Lista de Símbolos	xxv
1 Introdução	1
1.1 Notas introdutórias	2
1.2 Objetivos propostos	2
1.3 Erosão dentária - Contextualização do tema a abordar	3
1.4 Enquadramento teórico	5
1.4.1 Anatomia do dente	5
1.4.2 Esmalte dentário	6
1.4.2.1 Composição e propriedades do esmalte	6
1.4.2.2 Estrutura e tipos esmalte	7
1.4.3 Processos de desgaste dentário	8
1.4.4 Erosão dentária	9
1.4.4.1 Etiologia da Erosão dentária	9
1.4.4.2 Mecanismo de formação	11
1.4.5 Ação de ácidos no esmalte dentário	11
1.4.6 Ação da saliva no esmalte dentário	12
1.4.6.1 Componentes salivares e o processo de remineralização dentária	13
1.5 Estado da Arte	15
2 Técnicas analíticas	19
2.1 Espectroscopia por fluorescência de raios-X	20
2.1.1 Raios-X e a sua interação com a matéria	20
2.1.2 Produção de raios-X	23
2.1.3 Fluorescência de raios-X – Princípios Físicos	23
2.1.4 Fluorescência de raios-X dispersiva em energia	24

2.1.5	Artefactos espectrais	27
2.2	Espetroscopia Raman	28
2.2.1	Raman – Princípios Físicos	28
2.2.2	Fluorescência nos espectros Raman	31
2.2.3	Espetroscopia μ -Raman confocal	31
3	Materiais e Métodos	33
3.1	Preparação dos espécimes - seleção, corte e categorização	34
3.2	Protocolo experimental de ciclos erosivos - modelo <i>in vitro</i>	36
3.2.1	Preparação da solução de saliva artificial	37
3.2.2	Medição do pH da Coca-Cola®	37
3.3	Análise por EDXRF	38
3.3.1	Equipamento de μ -EDXRF	38
3.3.1.1	Análise em superfície	38
3.3.1.2	Análise em perfil	40
3.3.2	Análise em superfície por EDXRF com geometria triaxial	44
3.4	Análise por μ -Raman Confocal	46
3.4.1	Equipamento μ -Raman Confocal	46
3.4.2	Análise em superfície	49
3.4.3	Análise em perfil	49
4	Resultados	53
4.1	Estudo da desmineralização em superfície	54
4.1.1	Variação dos vários constituintes elementares – análise por μ -EDXRF	54
4.1.2	Avaliação da alteração do número atômico efetivo (Z_{ef}) por comparação dos picos de Rayleigh e Compton no espectro de EDXRF com geometria triaxial	57
4.1.3	Avaliar alterações da razão de despolarização no esmalte como medida de alteração da estrutura cristalina da HA - análise por μ -Raman Confocal	58
4.2	Estudo da profundidade de desmineralização	60
4.2.1	Análise por μ -EDXRF	60
4.2.2	Análise por μ -Raman Confocal	61
5	Discussão de resultados	65
6	Conclusões e Perspetivas futuras	69
6.1	Conclusões	70
6.2	Perspetivas futuras	71
	Referências Bibliográficas	73
A	Apêndice A	81

B	Apêndice B	85
C	Apêndice C	89
D	Apêndice D - Exposição do trabalho	93

Lista de Figuras

1.1	Diagrama da estrutura do estudo.	3
1.2	Gráfico de barras com a frequência do consumo de refrigerantes por sexo e total, Portugal Continental, 2014.	4
1.3	Representação das várias estruturas e tecidos constituintes do dente.	5
1.4	Representação do conjunto de dentes na cavidade oral.	6
1.5	Imagem da camada de esmalte aprismático (A) e prismático (B) e das bandas de <i>Hunter-Schreger</i>	8
1.6	Esquema ilustrativo da interação dos diferentes fatores no desenvolvimento do desgaste dentário por erosão dentária.	10
1.7	Gráfico das curvas de solubilidade para a HA, FAP e esmalte em função do pH e da combinação das concentrações totais de cálcio T_{Ca} e fosfato T_P na saliva.	14
2.1	Representação do átomo na ocorrência do efeito fotoelétrico.	21
2.2	Representação do átomo na ocorrência da dispersão de Compton.	22
2.3	Representação do átomo na ocorrência de emissão de fluorescência de raios-X.	24
2.4	Esquema representativo dos componentes principais de um espéctrometro de μ -EDXRF.	25
2.5	Esquema representativo da geometria triaxial.	26
2.6	Diagrama dos níveis de energia: representação dos estados envolvidos num sinal de Raman.	29
2.7	Espetro Raman da matriz de HA do esmalte.	30
2.8	Representação de um espetrómetro μ -Raman confocal.	32
3.1	Fotografia da máquina de corte com lâmina de precisão utilizada no corte dos espécimes.	34
3.2	Ilustração das sequências de corte realizadas para obtenção dos espécimes.	35
3.3	Ilustração do modelo <i>in vitro</i> e do ciclo erosivo executado no protocolo experimental de ciclos erosivos desenvolvido para simulação do consumo abusivo do refrigerante.	36
3.4	Fotografia de um espécime em perfil montado em cera.	40
3.5	Imagem vídeo obtida pela câmara no interior do equipamento de μ -EDXRF onde está registada a área de mapeamento do espécime para a análise em perfil.	42

3.6	Imagem do mapeamento total obtido resultante da análise em perfil por μ -EDXRF.	42
3.7	Gráficos resultantes do tratamento dos resultados obtidos no estudo da profundidade de desmineralização por μ -EDXRF.	43
3.8	Espetro de EDXRF da superfície de esmalte obtido por análise com geometria triaxial.	44
3.9	Fotografia do espécime montado na folha de <i>mylar</i> para análise por EDXRF.	45
3.10	Espetro Raman com identificação dos modos de vibração do grupo fosfato (PO_4^{3-}) da HA de esmalte.	46
3.11	Esquema representativo do posicionamento dos polarizadores para determinação do ângulo (θ) entre a direção de polarização do laser de incidência na amostra e a direção do polarizador analisador (PA).	47
3.12	Comparação dos espectros de Raman da superfície de HA adquiridos com os polarizadores paralelos e perpendiculares entre si para o espécime S_4	48
3.13	Fotografia do espécime controle C_1 montado em resina.	50
3.14	Sequência de cortes para análise em perfil por μ -Raman Confocal após execução do protocolo de ciclos erosivos.	50
3.15	Imagem obtida pela câmara acoplada ao microscópio de Raman onde estão registradas as coordenadas da posição da linha no espécime para análise em perfil.	51
4.1	Gráfico de barras com comparação da concentração de Ca (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	54
4.2	Gráfico de barras com comparação da concentração de P (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	55
4.3	Gráfico de barras com comparação da concentração de Sr (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	55
4.4	Gráfico de barras com comparação da concentração de S (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	56
4.5	Gráfico de barras com comparação da concentração de Fe (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	56
4.6	Gráfico de barras com comparação da concentração de Zn (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	57
4.7	Gráfico com comparação da razão Rayleigh/Compton antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	58
4.8	Gráfico com comparação da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos.	59
4.9	Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	60

4.10 Gráficos com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para os grupos experimentais A e C.	62
B.1 Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	85
B.2 Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	85
B.3 Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	86
B.4 Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	86
B.5 Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	87
B.6 Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos.	87
C.1 Gráfico com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para o grupo experimental B.	89
C.2 Gráfico com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para o grupo experimental D.	90
C.3 Gráfico com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para o grupo experimental E.	91
D.1 Poster científico apresentado no <i>1st Nova Biomedical Engineering Workshop 2017</i>	93

Lista de Tabelas

1.1	Causas dos principais processos responsáveis pelo desgaste dos tecidos dentários	9
2.1	Vantagens e limitações associadas à técnica de EDXRF	25
2.2	Vantagens e limitações associadas à técnica μ -Raman confocal	32
3.1	Categorização dos diferentes grupos de espécimes por tipo de análise realizada e técnica analítica utilizada	35
3.2	Massa de reagentes para preparação de 1 L de SAGF	37
3.3	Condições experimentais de aquisição dos mapeamentos na análise em superfície.	38
3.4	Concentração obtida pelo <i>software</i> MQuant \pm incerteza para os materiais padrão <i>NIST SRM 1400 Bone ash</i> e <i>NYS RM 05-04 Caprine bone</i> e limites de detecção obtidos para <i>NYS RM 05-04 Caprine bone</i>	40
3.5	Condições experimentais de aquisição dos mapeamentos na análise em profundidade.	41
3.6	Condições experimentais de aquisição de um espectro na análise de μ -Raman em superfície.	49
4.1	Tabela com deslocamentos (μm) da posição do máximo de mineralização do Ca e do P após execução do protocolo de ciclos erosivos	61
4.2	Tabela com intervalos de profundidade de desmineralização (μm) após execução do protocolo de ciclos erosivos.	63
A.1	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_1	81
A.2	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_2	81
A.3	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_3	82
A.4	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_4	82

A.5	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de cilos erosivos para o espécime T_5	82
A.6	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de cilos erosivos para o espécime T_6	83
A.7	Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de cilos erosivos para o espécime T_7	83

Lista de Acrónimos e Siglas

EDXRF	<i>Energy-dispersive X-ray fluorescence</i> (fluorescência de raios-X dispersiva em energia).
FabLab	<i>Fabrication Laboratory</i> .
FAP	Flúorapatite.
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.
FMDUL	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa.
GIBBO	Grupo de Investigação de Biologia e Bioquímica Oral.
HA	Hidroxiapatite.
HSB	<i>Hunter-Schreger Band</i> (Bandas de Hunter-Schreger).
LibPhys	Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física das Radiações.
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento.
RD	Razão de despolarização.
SAGF	<i>Artificial Saliva Gal Fovet</i> .
u.a.	unidades arbitrárias.
XRF	<i>X-ray fluorescence</i> (fluorescência de raios-X).

Lista de Símbolos

λ	Comprimento de onda da radiação
μ	Coefficiente de atenuação linear
ν	Frequência da radiação
ρ	Densidade do material
θ	Ângulo
A_i	Fator de atenuação na amostra
c_i	Concentração do elemento i
E_m	Energia vibracional ou rotacional da molécula
h	Constante de <i>Planck</i>
$I_{(960)\parallel}$	Integral do pico de intensidade da elongação simétrica ν_1 do grupo PO_4^{3-} adquirido com o polarizador analisador (PA) orientado paralelamente (\parallel) à direção de polarização do laser linearmente polarizado
$I_{(960)\perp}$	Integral do pico de intensidade da elongação simétrica ν_1 do grupo PO_4^{3-} adquirido com o polarizador analisador (PA) orientado perpendicularmente (\perp) à direção de polarização do laser linearmente polarizado
I_0	Intensidade inicial da radiação
I_i	Intensidade da radiação X característica do elemento i
K	Energia cinética do elétron
k_i	Fator de calibração experimental
m	Massa por unidade de área
Z	Número atômico
Z_{ef}	Número atômico efetivo

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ Ureia

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$ Fluorapatite

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ Hidroxiapatite

$\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_z(\text{OH})_{2-u}\text{F}_u$ Hidroxiapatite carbonatada deficiente em cálcio

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Cloreto de cálcio dihidratado

CO_3^{2-} Grupo carbonato

H_2PO_4 Dihidrogenofosfato

HCO_3 Bicarbonato

HPO_4 Hidrogenofosfato

KCl Cloreto de potássio

KH_2PO_4 Dihidrogenofosfato de potássio

KSCN Tiocianato de potássio

$\text{Na} \cdot 2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de sódio decahidratado

NaCl Cloreto de sódio

NaHCO_3 Bicarbonato de sódio

NH_4Cl Cloreto de amónio

OH^- Grupo hidroxilo

PO_4^{3-} Grupo fosfato

$\text{K}\alpha$ Riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X

1 | Introdução

O presente capítulo começa com uma descrição geral da estrutura da dissertação, na secção 1.1. Seguidamente, na secção 1.2, estão descritos os objetivos específicos do trabalho. Na secção 1.3 é apresentada uma breve contextualização do tema a abordar que conta com uma visão geral do crescente desenvolvimento da condição de erosão dentária. Na secção 1.4 é apresentado um enquadramento teórico onde são abordados conceitos fundamentais para o entendimento e desenvolvimento do trabalho: conceitos relacionados com a anatomia dentária, esmalte dentário, assim como com a condição de erosão dentária. Para terminar, na secção 1.5 é apresentada uma revisão da literatura sobre estudos de interesse para este trabalho.

1.1 Notas introdutórias

A presente dissertação está organizada em cinco capítulos principais. O presente capítulo é uma introdução ao trabalho, onde é apresentada uma contextualização e enquadramento teórico do tema a abordar. O capítulo 2 conta com a exploração dos princípios físicos em que se baseiam as técnicas analíticas utilizadas durante o trabalho, como técnicas promissoras não destrutivas para análise de amostras biológicas. O capítulo 3 apresenta a descrição dos materiais e métodos utilizados no estudo, desde a seleção dos espécimes, ao tipo de análise e estudo realizado com cada grupo experimental e o respetivo tratamento de resultados. No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos com as diferentes metodologias e o capítulo 5 é dedicado à discussão dos mesmos. Por fim, o capítulo 6 apresenta as conclusões mais relevantes do trabalho e uma breve abordagem a perspetivas futuras em estudos na área.

1.2 Objetivos propostos

Neste trabalho é estudado o efeito do consumo abusivo de um refrigerante ácido em espécimes de esmalte humano, com o objetivo de avaliar o seu potencial erosivo, em superfície e em profundidade. Do estudo fazem parte 4 grupos experimentais, diferenciados pelo tipo de análise realizada (análise em superfície e/ou em perfil) e pela técnica analítica utilizada (EDXRF e/ou Raman). São objetivos específicos deste trabalho o:

Estudo da desmineralização em superfície

1. Avaliar alteração da composição elementar dos elementos *major* e traço por μ -EDXRF;
2. Avaliar alteração do número atómico efetivo (Z_{ef}) dos espécimes por comparação dos picos de dispersão de Rayleigh e Compton no espectro de EDXRF;
3. Avaliar alterações da razão de despolarização no esmalte como medida de alteração da estrutura cristalina da hidroxiapatite (HA) por μ -Raman confocal;

Estudo da profundidade de desmineralização

1. Avaliar o comportamento do Ca e do P ao longo de *line scans* extraídas a partir de mapeamentos adquiridos em perfil por μ -EDXRF;
2. Avaliar a evolução da razão de despolarização ao longo de linhas adquiridas em perfil por μ -Raman confocal;

Na Figura 1.1 encontra-se um diagrama explicativo da estrutura de todo o estudo desenvolvido na presente dissertação.

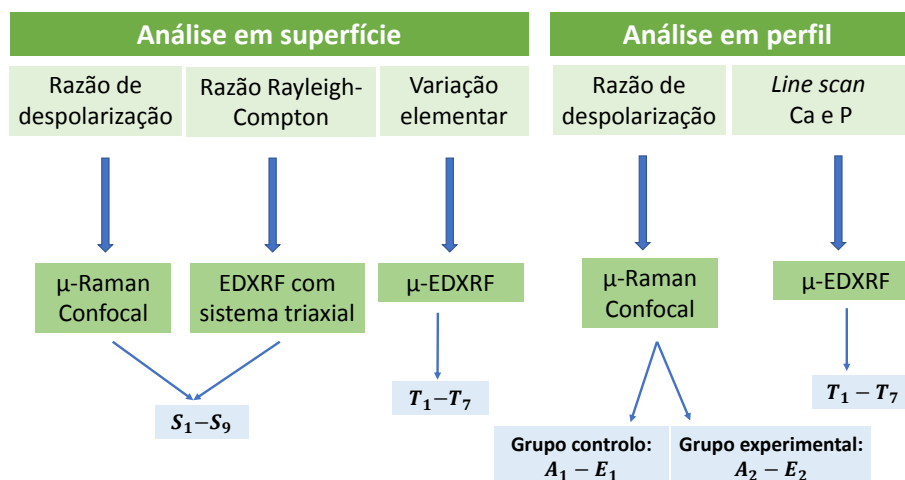


Figura 1.1: Diagrama da estrutura do estudo.

1.3 Erosão dentária - Contextualização do tema a abordar

Nos últimos anos, a incidência de casos de erosão dentária tem vindo a aumentar substancialmente, principalmente entre crianças e adolescentes [1]. O estilo de vida moderno, com novos hábitos alimentares e comportamentais, tem vindo a contribuir para o aumento da perda irreversível de tecidos dentários duros, sendo considerado um fator de grande relevância na gestão da saúde oral a longo prazo.

Das diversas causas que estão na origem da erosão dentária destaca-se, com maior impacto, o consumo excessivo de bebidas ácidas (refrigerantes, bebidas energéticas, sumos de frutas industrializados), que se revelam alimentos cada vez mais presentes nos hábitos alimentares diários dos jovens.

De facto, o aumento do consumo de refrigerantes tem vindo a tornar-se um problema de saúde pública visível e controverso pois, para além dos muitos problemas de saúde associados ao seu consumo excessivo, como a obesidade, outros relacionados com a saúde odontológica começam a ganhar relevância [2].

Segundo o relatório de Alimentação Saudável em Números – 2015, redigido pela Direção Geral de Saúde, mais de 50% dos jovens e crianças portuguesas consomem refrigerantes pelo menos uma vez por semana e cerca de 20% consomem refrigerantes diariamente, como apresentado no gráfico da Figura 1.2 [3].

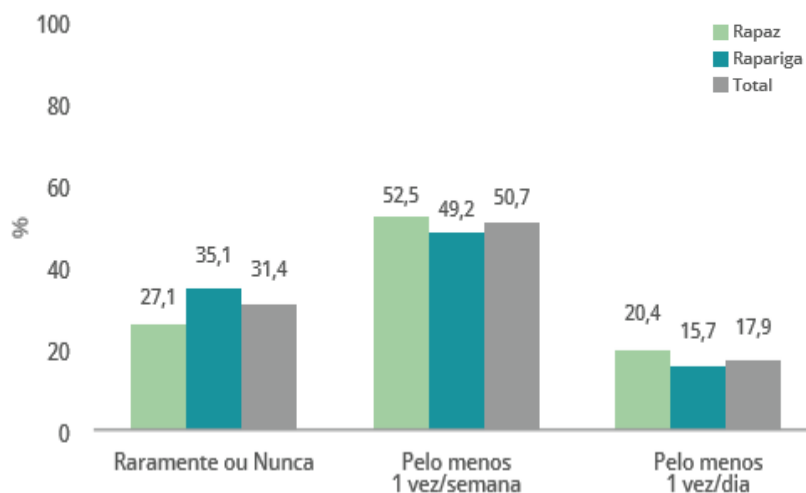


Figura 1.2: Gráfico de barras com a frequência do consumo de refrigerantes por sexo e total, Portugal Continental, 2014 ¹ (Adaptado de ref. [3]).

O conhecimento dos potenciais erosivos das diferentes bebidas permite a implementação de medidas preventivas adequadas à minimização dos danos e perda de tecido dentário. Sendo o esmalte dentário um tecido acelular altamente mineralizado e sem capacidade de autorregeneração, a compreensão dos mecanismos que estão por detrás dos processos da sua degradação representa um desafio de grande interesse para a comunidade científica e odontológica [1].

Vários estudos têm sido feitos com o intuito de compreender a ligação entre o consumo de refrigerantes e o desenvolvimento da erosão dentária. Um dos grandes objetivos futuros destes estudos é compreender, a nível microscópico, os vários mecanismos da erosão dentária, assim como encontrar uma maneira de medir os seus vários estágios iniciais, que são imperceptíveis de diagnosticar a olho nu. Como explicado por Klaus D. Jandt num dos seus estudos:

"Se fosse possível detetar e medir os estágios iniciais da desmineralização dentária (erosão), e reverter este processo através da remineralização do esmalte enfraquecido, teria sido encontrada a base da reparação da erosão dentária." [1]

¹Dados provenientes do estudo HBSC/OMS (*Health Behaviour in School-aged Children*), desenvolvido pela OMS onde participam atualmente mais de 44 países, incluindo Portugal. Este estudo é realizado de 4 em 4 anos e pretende avaliar os estilos de vida dos adolescentes e os seus comportamentos, nomeadamente no setor alimentar.

Assim, a crescente evolução de várias técnicas analíticas extremamente sensíveis e precisas em ciências dos materiais, disponíveis para as investigações em biomedicina, veio colmatar a necessidade de tecnologia adequada à compreensão destes fenómenos e revelou-se crucial no diagnóstico e aplicação de terapias cada vez mais específicas e direcionadas [1].

1.4 Enquadramento teórico

1.4.1 Anatomia do dente

Os dentes são estruturas extremamente duras e calcificadas e estão fixos aos ossos por meio de fibras colagêneas, que constituem o ligamento alvéolo-dental ou ligamento periodontal [4].

Cada dente é constituído por duas partes: uma parte visível, a coroa, e uma parte implantada nos alvéolos dentais, a raiz. As duas porções são limitadas por uma zona apertada, formando uma linha sinuosa, o colo do dente [5].

O dente apresenta interiormente uma cavidade central, a cavidade pulpar contendo a polpa do dente, em volta da qual existe a dentina. A dentina é revestida, na sua parte coronal, pelo esmalte, um tecido extremamente duro, acelular e sem capacidade de regeneração. Por sua vez, a raiz do dente está revestida pelo cimento, tecido que ajuda na fixação do dente à mandíbula/maxilar [5, 6] (Figura 1.3).

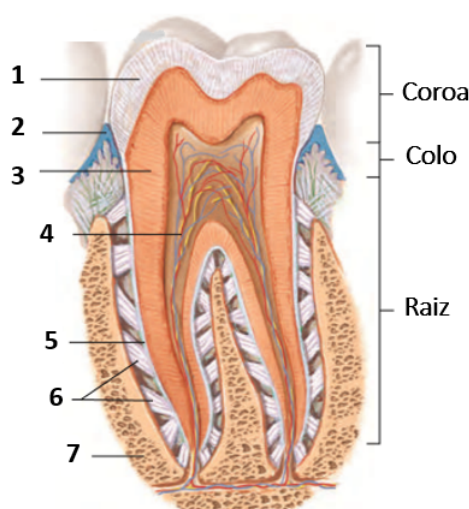


Figura 1.3: Representação das várias estruturas e tecidos constituintes do dente: 1- Esmalte, 2- Gengiva, 3-Dentina, 4-Cavidade Pulpar, 5-Cimento, 6-Ligamentos periodontais, 7-Osso alveolar (Adaptado de [6]).

Os dentes, em conjunto, desempenham as funções de mastigação, proteção e sustentação de tecidos moles relacionados, auxiliam na articulação das palavras e são um importante fator na estética da face [4]. A dentição adulta é constituída por 32 dentes localizados na mandíbula e no maxilar. Na Figura 1.4 encontra-se representado um esquema ilustrativo dos dentes na cavidade oral.

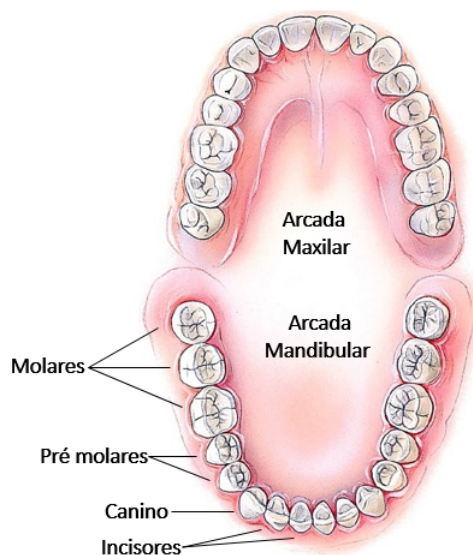


Figura 1.4: Representação do conjunto de dentes na cavidade oral (Adaptado de [6]).

1.4.2 Esmalte dentário

1.4.2.1 Composição e propriedades do esmalte

O esmalte é o tecido mais mineralizado do corpo humano, constituído por 96%-98% de conteúdo mineral, 2%-4% de matéria orgânica e água [7].

O seu conteúdo mineral é composto por cristais de hidroxiapatite inorgânica (HA), de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, incorporados numa matriz proteica orgânica. Este mineral está presente no esmalte na sua forma não pura, $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_z(\text{OH})_{2-u}\text{F}_u$, também designada por HA carbonatada deficiente em cálcio. Assim, a ocorrência de substituições iónicas na matriz de HA é um processo regular: alguns iões cálcio (Ca^{2+}) podem ser substituídos por outros iões, como o sódio (Na^+), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+), estrôncio (Sr^{2+}), entre outros, sendo estes denominados elementos traço da composição elementar do esmalte. O grupo hidroxilo (OH^-) pode ser substituído por flúor (fluorapatite, FAP) e o grupo fosfato (PO_4^{3-}) pelo grupo carbonato (CO_3^{2-}). Todas as substituições que ocorrem na rede cristalográfica mineral do esmalte, especialmente a substituição do grupo PO_4^{3-} pelo grupo CO_3^{2-} , alteram a sua estrutura tornando-o mais solúvel que a HA pura, quando exposto a

substâncias ácidas. Por sua vez, a HA pura é muito mais solúvel que a FAP, de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$ [8].

Quanto ao seu conteúdo orgânico, o esmalte é composto por diversas proteínas e lípidos. As proteínas estão presentes principalmente como uma cobertura muito fina dos cristais de HA e compreendem aproximadamente metade do material orgânico, sendo a outra metade lipídica. Embora reduzido, o teor em água presente no esmalte é suficiente para promover a difusão de ácidos e outros componentes para o interior do dente, assim como a libertação dos iões cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}) para fora da rede cristalina, durante o processo de erosão dentária [8].

Não apresentando células no seu arranjo estrutural, ao contrário dos restantes tecidos conjuntivos mineralizados do organismo, o esmalte não apresenta capacidade de regeneração. As únicas alterações que se podem observar na estrutura cristalina ocorrem a nível superficial pelo facto da superfície do esmalte se encontrar em contato com a saliva, um fluido supersaturado em fosfato de cálcio [9]. Desta forma, as modificações que ocorrem a nível da superfície do esmalte tornar-se-ão irreversíveis caso a capacidade remineralizante da saliva não supere o dano provocado ao esmalte dentário [10].

1.4.2.2 Estrutura e tipos esmalte

O esmalte humano tem uma espessura que pode variar em cerca de 1 a 2,3 mm ao longo da superfície dentária e frequentemente é mais espessa nas cúspides e mais fina na zona do colo do dente [11]. A sua estrutura é constituída por prismas de secção hexagonal e diâmetro que pode variar entre 3 a 6 μm . Os prismas são compostos por cristais de HA de largura e espessura médias de, aproximadamente, 68 nm e 26 nm, respetivamente. A ordem de grandeza do comprimento dos cristais é de, aproximadamente, 160 nm [1].

A totalidade de esmalte que constitui o dente pode ser dividido em dois tipos: esmalte **aprismático** e **prismático**. O esmalte aprismático constitui a camada mais superficial, enquanto que na parte mais interna do esmalte maduro humano se encontra o esmalte prismático, que se estende até à dentina. O desenvolvimento do esmalte aprismático bem ordenado é condicionado pelo processo de amelogenese (processo de biomineralização dinâmico, coordenado e bastante complexo, que resulta na formação do esmalte dentário) e pelos ameloblastos (células responsáveis pela regulação deste processo), enquanto que o esmalte prismático é menos regulado deste ponto de vista [12].

A camada de esmalte aprismático tem uma espessura de, aproximadamente, 100 μm e os seus cristais de HA estão orientados paralelamente entre si e perpendiculares à superfície do dente. É a camada mais mineralizada e menos porosa devido à ausência

de espaço entre os cristais, onde a maior parte da matéria orgânica está localizada. Por sua vez, no esmalte prismático os cristais de HA estão dispostos segundo um padrão resultante de variações nas orientações dos cristais. Desta forma, alguns prismas apresentam uma direção longitudinal, enquanto que outros, uma direção transversal [1, 12]. Na Figura 1.5 é possível visualizar o aparecimento de faixas escuras e claras na camada de esmalte, também designadas de bandas de *Hunter-Schreger* (HSB), resultantes da variação na direção dos prismas.

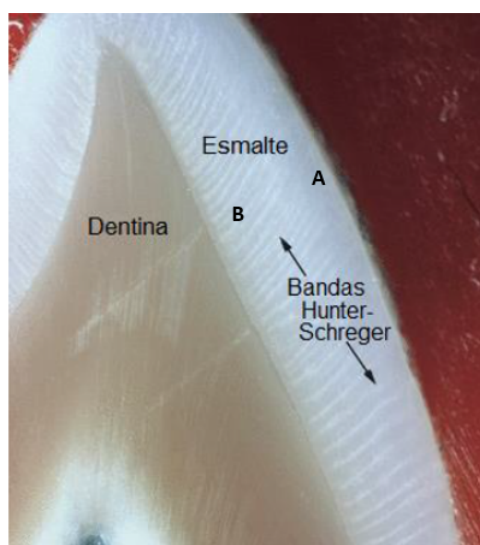


Figura 1.5: Imagem da camada de esmalte aprismático (A) e prismático (B) e das HSB resultantes da variação da orientação dos cristais de HA no esmalte. O padrão das HSB foi observado com recurso a um microscópio com uma lente objetiva 4x (Adaptado de ref. [13]).

1.4.3 Processos de desgaste dentário

Desgaste dentário é o termo usado para designar a perda de tecidos dentários duros não provocada por defeitos de desenvolvimento, cáries dentárias ou traumatismos e é caracterizado pela perda da forma dentária anatómica original [14].

Ao longo da vida, os dentes estão sujeitos a um conjunto de agressões químicas e físicas que contribuem para o seu desgaste. Como apresentado na Tabela 1.1, podem classificar-se quatro tipos de perda irreversível de tecido dentário duro de origem não bacteriana: abrasão, atrição, abfração e erosão [15, 16].

Tabela 1.1: Causas dos principais processos responsáveis pelo desgaste dos tecidos dentários

Terminologia	Causas da perda de tecido dental duro
Abrasão	Fricção de objetos e/ou substâncias externas à cavidade oral; pode ocorrer durante a mastigação, devido a escovagem traumática e uso de escovas de dentes excessivamente duras, exposição dos dentes a substâncias abrasivas, entre outros.
Atrição	Desgaste físico resultante da ação de dentes antagónicos sem intervenção de substâncias ou objetos externos.
Abfração	Desgaste físico resultante de forças oclusais (forças musculares aplicadas aos dentes oponentes) que provocam flexões nos dentes levando à fratura dos cristais de esmalte na zona do colo do dente e ao seu desgaste.
Erosão	Dissolução mineral dos tecidos dentários decorrente de processos químicos (presença de ácidos e/ou agentes quelantes na cavidade oral), sem ação bacteriana.

A perda de tecido dentário é insidiosa por natureza e pode não ser evidente até que o paciente relate sintomas. As características associadas a cada um destes processos são únicas, mas raramente atuam de forma isolada, sendo o desgaste dentário resultante da interação simultânea, cooperativa e/ou aditiva destes processos [14].

Visto que neste trabalho vai ser estudada a ação de substâncias ácidas em esmalte dentário, o processo de erosão será descrito com maior detalhe.

1.4.4 Erosão dentária

O processo de erosão dentária ocorre quando substâncias ácidas se difundem através da placa e da película, atingindo o esmalte. Estas substâncias têm, geralmente, um pH inferior aos valores de pH críticos para os tecidos minerais dentários (4,5 para a FAP e 5,5 para a HA) e provocam a diminuição do pH intraoral, contribuindo diretamente para a desmineralização dentária. Consequentemente, os minerais dissolvidos difundem para fora da estrutura do dente e para a saliva envolvente [17, 18].

A erosão começa com a dissolução mineral das camadas superficiais do esmalte, podendo evoluir para as camadas mais internas e, em casos mais extremos, chegar à dentina [1].

1.4.4.1 Etiologia da Erosão dentária

De acordo com a sua etiologia, a erosão dentária pode ser designada de endógena, exógena ou idiopática, *i.e.* de origem desconhecida, dependendo da origem dos ácidos responsáveis pelo desgaste dentário [14]. De acordo com a literatura, a causa *major* para o desenvolvimento da erosão dentária prende-se com causas exógenas, nomeadamente com os hábitos alimentares ricos em alimentos e bebidas ácidas.

Como representado na Figura 1.6, diversos fatores estão na origem da erosão dentária, o que a torna uma condição multifatorial: a interação entre fatores químicos, biológicos e comportamentais é crucial para o seu desenvolvimento [19].

O potencial erosivo de substâncias ácidas, como bebidas e alimentos ácidos, depende de vários fatores químicos, como o seu pH, acidez titulável, teor mineral e propriedades quelantes. Fatores biológicos como a saliva, estrutura e posicionamento do dente em relação aos tecidos moles e língua estão relacionados com a patogênese da erosão dentária. Para além disso, fatores comportamentais como hábitos alimentares, medicação, exercício físico regular com consequente desidratação e diminuição do fluxo salivar, higiene oral excessiva e, por outro lado, um estilo de vida pouco saudável (alcoolismo e tabagismo) são fatores predisponentes para a erosão dentária [19, 20].

Outras causas menos comuns, como o aumento e prevalência de várias doenças gastrointestinais e distúrbios alimentares, de que são exemplo o refluxo gastroesofágico, bulimia, anorexia, levam a um contacto frequente dos dentes com ácidos provenientes do estômago [1]. Um desses ácidos é o ácido gástrico que tem um pH de aproximadamente 1 e que, uma vez na cavidade oral, tem elevado potencial para danificar os dentes [21].

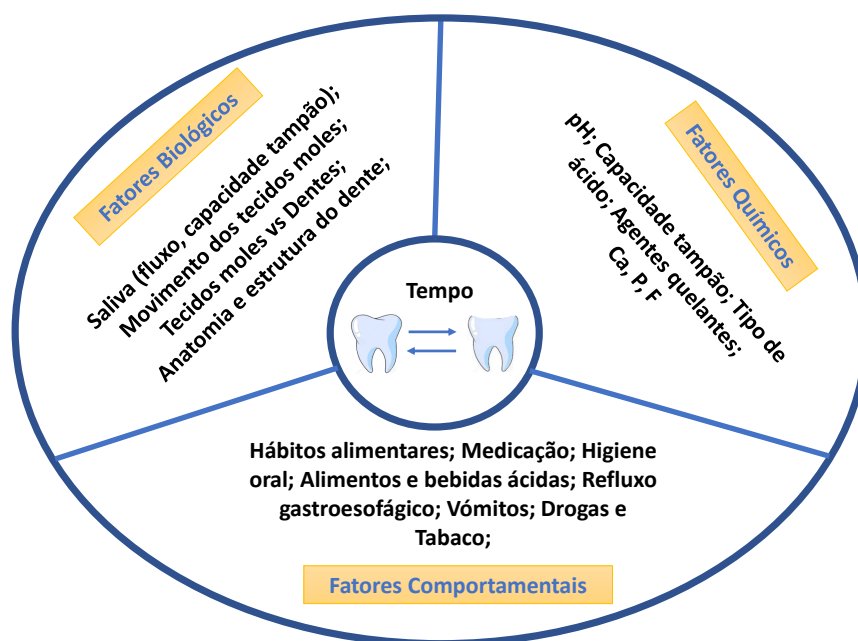


Figura 1.6: Esquema ilustrativo da interação dos diferentes fatores no desenvolvimento do desgaste dentário por erosão dentária (Adaptado de ref. [15]).

1.4.4.2 Mecanismo de formação

No decorrer do processo de erosão dentária induzida por alimentos/bebidas a perda de tecido duro dental subdivide-se em três etapas principais [1, 17]:

1. Perda de substâncias orgânicas salivares, que cobrem e protegem a superfície do dente, resultando numa desmineralização precoce - amolecimento do esmalte dentário e mudanças estruturais numa escala nanoscópica;
2. O dente perde o seu conteúdo mineral, devido à ação de um agente erosivo - ocorre perda microscópica de material e colapso estrutural do tecido dental duro;
3. Por fim, ocorre alteração/destruição macroscópica da superfície dentária por ações bioquímicas, biofísicas e/ou mecânicas - a erosão é visível a olho nu e pode ser diagnosticada pelo médico dentista.

1.4.5 Ação de ácidos no esmalte dentário

Os refrigerantes e sumos de fruta disponíveis comercialmente são ricos em ácidos que, para além de melhorarem o seu sabor, também atuam como conservantes. O ácido que se encontra em maior concentração neste tipo de bebidas é o ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), mas também podem conter outros ácidos como o ácido fosfórico (H_3PO_4), ascórbico ($C_6H_8O_6$) ou ácido láctico ($C_3H_6O_3$). As bebidas efervescentes contêm ainda ácido carbónico (H_2CO_3), que resulta da dissolução do dióxido de carbono (CO_2) em água (H_2O), segundo a reação química 1.1 [1]:



Outro ácido importante no processo de erosão dentária é o ácido clorídrico (HCl) que, em contacto com a água, se dissocia completamente em iões hidrogénio e iões cloreto, dissolvendo e removendo rapidamente a superfície mineral do esmalte [8].

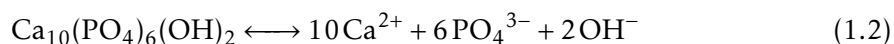
Após ingestão de bebidas ácidas, o pH intraoral decresce dentro de 2 a 3 minutos e demora cerca de 25 minutos a ser reestabelecido, à medida que a saliva neutraliza qualquer resto de ácido que tenha ficado retido na cavidade oral [22].

A erosão química dos dentes é mediada pelos iões hidrogénio (H^+) derivados de ácidos, ou por aniões, também designados de agentes quelantes. Estes últimos podem ligar-se ao cálcio da matriz de hidroxiapatite removendo-os da superfície do dente [8].

Os ácidos ao entrarem em contacto com a superfície do esmalte libertam os seus iões hidrogénio (H^+) que, por sua vez, se combinam com o grupo fosfato e/ou carbonato dos

cristais de HA carbonatada, libertando-os para fora da estrutura cristalina [8, 19].

A equação química 1.2 descreve a dissociação da HA pura [22]:



Os tecidos dentários duros irão sofrer processos de desmineralização ou remineralização, dependendo da acidez da saliva circundante. Se o pH intraoral descer (aumento da acidez e da concentração de íons H^+), os íons 6PO_4^{3-} são convertidos em $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ ou H_2PO_4^- e os íons OH^- são neutralizados, com consequente formação de moléculas de água, conduzindo a reação na dissolução do cálcio e do fosfato. Por outro lado, se a concentração de íons H^+ diminuir, *i.e.*, o pH aumenta e a acidez do meio diminui, a reação é direcionada no sentido da remineralização dos tecidos dentários [22].

A exposição repetida a bebidas ácidas altera o pH intraoral para valores a baixo do pH crítico da HA (pH = 5,5), ocorrendo dissolução química dos seus cristais. Geralmente, a extensão da erosão dentária observada *in vivo* depende da interação de vários fatores: frequência de consumo, modo de beber (uso de palhinha), tipo de ácido presente e tempo de exposição do ácido na cavidade oral [22, 23].

1.4.6 Ação da saliva no esmalte dentário

A saliva é um fluido biológico de extrema importância na manutenção da saúde oral e na prevenção da erosão dentária, desencadeando mecanismos de proteção como resposta aos ataques ácidos na cavidade oral [9].

Das suas mais variadas funções destacam-se [11, 18]:

- Lubrificação e proteção da cavidade oral durante a mastigação, deglutição e fala;
- Capacidade tampão e remineralizante para manter a integridade do esmalte;
- Ação antibacteriana;

A capacidade tampão da saliva influencia o pH da placa que envolve o esmalte. O pH neutro na cavidade oral é mantido devido à capacidade tampão da saliva – capacidade da saliva manter o seu pH constante a 6,9-7,0 graças aos seus tampões ($\text{HCO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3$ e $\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$) que bloqueiam o excesso de ácidos e bases. A remineralização é o processo de substituição de minerais perdidos através da matriz orgânica do esmalte para os seus cristais. A supersaturação de minerais na saliva é mantida por diversas proteínas e desempenha um papel remineralizante dos tecidos dentários [18, 24].

1.4.6.1 Componentes salivares e o processo de remineralização dentária

A saliva é maioritariamente constituída por água (99%) e o restante 1% é constituído por iões e componentes orgânicos [11]. Da sua compisição fazem parte o sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), bicarbonato (HCO_3), fosfatos, proteínas, lípidos, enzimas, imunoglobulinas, mucinas e produtos nitrogenados, como ureia e amônia [18].

Os bicarbonatos, fosfatos e ureia atuam na modulação do pH e da capacidade tampão da saliva; as proteínas e mucinas contribuem para o metabolismo da placa dental; o cálcio, o fosfato e as proteínas trabalham em conjunto como um fator de antisolubilidade e modulam a desmineralização e remineralização; as imunoglobulinas, proteínas e enzimas fornecem ação antibacteriana [18].

No que diz respeito aos componentes orgânicos, um grande número de proteínas e lípidos salivares estão envolvidos no processo de formação de películas que revestem a superfície dos dentes formando uma barreira de difusão que protege a superfície dentária dos ataques de ácidos [8, 18].

Relativamente aos componentes iónicos, o **ião cálcio**, o **ião fosfato** e o **flúor** desempenham um papel bastante importante no processo de remineralização dentária. O cálcio ajuda a manter o equilíbrio entre a concentração de cálcio na HA do esmalte e os fluidos circundantes e a sua concentração na saliva, assim como a do fosfato, é determinada pelo pH intraoral. A presença de flúor na saliva é responsável pela formação de um revestimento de FAP mais resistente aos ácidos do que a HA. Por sua vez, a concentração de flúor presente na saliva é maioritariamente determinada pela contribuição externa, através de produtos tópicos ou sistémicos, como pastas dentífricas, elixires orais, entre outros [18, 24].

Estes 3 componentes minerais são bastante importantes quando se consideram ataques erosivos devido a consumo de bebidas acidificadas e, dependendo da sua concentração salivar, podem alterar a solubilidade da HA, FAP e do esmlate. O gráfico da Figura 1.7 mostra o *plot* das curvas de solubilidade (escala logarítmica) destes minerais em função do pH e da combinação das concentrações totais de cálcio (T_{Ca}) e fosfato (T_P) na saliva [8].

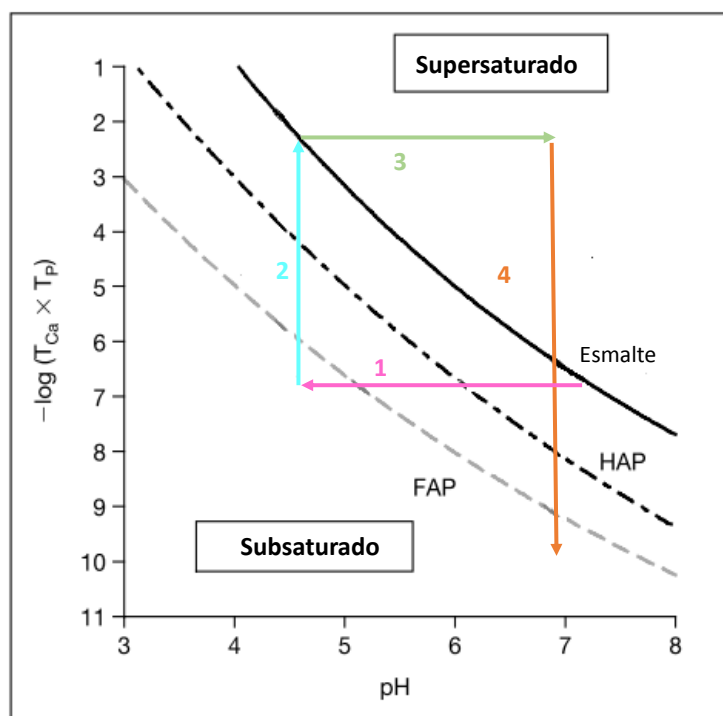


Figura 1.7: Gráfico das curvas de solubilidade para a HA, FAP e esmalte em função do pH e da combinação das concentrações totais de cálcio T_{Ca} e fosfato T_P na saliva - representação em escala logarítmica (Adaptado de ref. [8]).

Interpretação do gráfico da Figura 1.7 [8]:

A curva de solubilidade do esmalte está acima da curva da HA, que por sua vez está acima da curva da FAP, indicando ordens de magnitude diferentes na solubilidade entre os minerais.

As combinações de Ca e PO_4^{3-} em solução acima de qualquer curva são chamadas de "supersaturadas" em relação ao mineral e, nestas condições, o mineral não se dissolve. Abaixo da curva, são "subsaturadas" e o mineral pode dissolver-se.

Os passos numerados representam diferentes estágios na perda mineral devido a ataques ácidos. Começando num ponto na superfície do esmalte, à medida que este é atacado por uma substância ácida ocorre uma descida do pH salivar de, por exemplo, 7,3 para 4,5 (seta nº 1) e, como a solução é subsaturada em relação ao mineral, ocorre dissolução de íons Ca e PO_4^{3-} para a saliva envolvente, aumentando a sua concentração salivar (seta nº 2). Após o ataque erosivo, a saliva neutraliza o ácido retornando ao pH neutro (seta nº 3): neste caso, o Ca e o PO_4^{3-} da saliva ou de outras fontes podem agora causar remineralização e, se existir fluoreto (F^-) suficiente na saliva, ocorre formação de uma nova superfície mineral, a FAP, muito menos solúvel em ácido (passo nº 4). Se não existir F^- , a seta nº 4 pára na curva de esmalte e repete-se o ciclo, com consequente dissolução do mineral.

A manipulação das concentrações de cálcio, fosfato e flúor em solução é uma das estratégias usadas na prevenção da erosão dentária. Um exemplo é a adição destes elementos em alimentos e bebidas, diminuindo o seu potencial erosivo, ou a utilização de produtos remineralizantes que aumentam a concentração salivar destes elementos.

1.5 Estado da Arte

A perda de tecido dentário duro é um problema cada vez mais reconhecido no ramo da saúde oral. Muitos são os fatores que contribuem para este processo, onde os ácidos aliados à dieta e os ácidos intrínsecos do estômago tomam especial importância e, ao longo dos anos, têm sido realizados vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, que demonstram erosão dentária severa resultante da ingestão de bebidas e alimentos artificialmente acidificados [22, 25–27].

A avaliação da estrutura mineral dentária, como as alterações da composição química e orgânica dos tecidos dentários são exemplos de abordagens típicas que permitem avaliar os efeitos da exposição dos dentes a substâncias ácidas. Outra abordagem consiste em determinar o potencial erosivo de substâncias ácidas através da medição dos iões perdidos para a solução.

Braga *et al* [28] investigaram o potencial erosivo de duas soluções ácidas (ácido gástrico, proveniente de um exame endoscópico, e de sumo de laranja) e os seus efeitos em esmalte dentário. As amostras em estudo foram submetidas a ciclos alternados de desmineralização, onde um ciclo completo consistiu na imersão das amostras em 3 mL de solução ácida sob leve agitação durante 5 min. Este ciclo foi repetido 4 vezes por dia, durante um total de 14 dias. Entre ciclos e durante a noite as amostras foram conservadas em saliva artificial. Após expostas aos ciclos de desmineralização, foi medido, através de espectroscopia por emissão atômica, a dissolução de cálcio (Ca^{2+}) nas soluções testadas. Este grupo de investigadores avaliou também as alterações morfológicas, através da técnica de microscopia eletrónica de varrimento (MEV), e a presença de carbonato (CO_3^{2-}) e fosfato (PO_4^{3-}), através da técnica de FT-Raman, nas amostras antes e após o desafio erosivo. A perda média de iões Ca^{2+} para a solução foi de: 12.74 ± 3.33 mg/L em ácido gástrico e 7.07 ± 1.44 mg/L em sumo de laranja, mostrando diferenças significativas entre o potencial erosivo dos dois agentes testados. Já a análise por FT-Raman não demonstrou alterações significativas na razão $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ das amostras. Com este estudo, os autores concluíram que o ácido gástrico causa maior alteração na composição mineral do esmalte do que o sumo de laranja, e que a análise por espectroscopia de emissão atômica se verificou mais adequada para analisar pequenas perdas minerais das amostras, quando

comparada com a análise por FT-Raman.

Pezzoti *et al* [29] utilizaram a espectroscopia Raman para avaliar a desmineralização *in vitro* ocorrida em dentes humanos saudáveis após exposição a uma bebida altamente ácida (Coca-Cola®, pH=2,5). Após imersão dos espécimes em Coca-Cola® durante períodos de tempo crescentes (30 s, 1, 3, 5, 10, 15, 20 e 30 min), os autores verificaram uma diminuição de intensidade e aumento da largura da banda correspondente ao alongamento simétrico do grupo PO_4^{3-} , que afirmam estar relacionado com a dissolução dos iões Ca^{2+} (principal processo da desmineralização). O mesmo foi verificado para a banda espectral referente ao alongamento molecular P–O do esmalte exposto ao ácido, comparativamente com o esmalte saudável, com o aumento de exposição ao agente ácido.

J. Zheng *et al* [30] investigaram, *in vitro*, o comportamento da erosão do esmalte dentário humano usando uma solução de ácido cítrico como agente desmineralizante. As seis amostras utilizadas neste estudo foram submersas, individualmente, em 50 mL de 0,001 M (concentração de ácido geralmente encontrada nos sumos de fruta) de solução de ácido cítrico (pH=3,2), durante períodos de tempo crescentes: 1, 3, 5, 10, 15 e 30 min. A composição da sua superfície foi medida acoplando um detetor dispersivo em energia ao microscópio electrónico de varrimento (MEV). Após o teste, verificou-se que o conteúdo de cálcio e iões fosfato na superfície do esmalte diminuiu com o aumento de tempo de exposição ao agente, não tendo sido obtida nenhuma relação linear entre eles.

Castro *et al* [31] estudaram a alteração do conteúdo mineral de amostras de esmalte exposto à ação de dois produtos de branqueamento dentário, quando excedidas as recomendações do fabricante. Durante a investigação foram utilizados 12 dentes saudáveis, divididos em dois grupos de 6, cada grupo tratado com um dos produtos. O conteúdo mineral das amostras foi obtido com recurso à técnica de espectrometria de μ -EDXRF e o perfil do fosfato (PO_4^{3-}) foi avaliado através da espectroscopia μ -Raman. Os resultados mostraram que ambos os produtos testados eram ácidos e que, após sete dias de tratamento, a desmineralização do esmalte começava a ser significativa.

Para além das alterações elementares da superfície dentária reportadas na literatura científica, existem alguns estudos que reportam a existência de alterações morfológicas, que também são indicativas do enfraquecimento dos tecidos dentários causado pela ação de substâncias ácidas.

Leme *et al* [32] compararam os efeitos do consumo de bebidas ácidas no desenvolvimento da erosão dentária. Na experiência foram testados, *in vitro*, quatro produtos potencialmente ácidos e disponíveis comercialmente: refrigerante de limão, sumo à base de soja com sabor a laranja, Gatorade® e Coca-Cola®. As amostras foram divididas em quatro grupos, de acordo com as soluções a serem testadas e foram imersas durante 5

minutos, 3 vezes ao dia, durante 30 dias. Posteriormente, recorreu-se à análise das amostras através da técnica de MEV e constatou-se que o esmalte dos dentes submetidos à ação de bebidas comercializadas apresentava morfologia díspar do registado no grupo de controlo. A desmineralização mais intensa foi observada para os espécimes submetidos à ação da Coca-Cola®.

L. A. Ehlen *et al* [33] estudaram, *in vitro*, o potencial erosivo de diferentes marcas de bebidas ácidas comercialmente disponíveis: sumo de maçã, Coca-Cola®, Coca-Cola Light®, Gatorade® e Red Bull®. Para a realização do estudo foram utilizados espécimes de dentes que foram suspensos nas bebidas referidas durante um total de 25 horas. Um microscópio de luz polarizada foi utilizado para analisar os espécimes e identificar as lesões, tanto a nível do esmalte como a nível da raiz. A profundidade (em μm) das lesões a nível da raiz foi mais acentuada, comparativamente com a profundidade das lesões a nível da superfície de esmalte. Verificou-se ainda que, independentemente da zona do dente analisada, as lesões das amostras expostas a Gatorade® foram mais acentuadas do que as das amostras expostas às restantes bebidas.

Em todos os estudos acima descritos foi obtida uma correlação positiva entre a exposição das amostras de dentes a substâncias ácidas e a diminuição das suas concentrações elementares, aliada a alterações morfológicas da sua estrutura inicial. Podemos, portanto, supor que estas bebidas terão um efeito de desmineralização sobre a superfície de esmalte.

2 | Técnicas analíticas

Neste capítulo encontram-se descritos os princípios físicos das duas técnicas espectroscópicas utilizadas ao longo deste trabalho, nomeadamente a técnica de Fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF) e a técnica de μ -Raman confocal, como técnicas promissoras não destrutivas para análise de amostras biológicas.

2.1 Espectroscopia por fluorescência de raios-X

2.1.1 Raios-X e a sua interação com a matéria

A radiação X é um tipo de radiação eletromagnética de alta energia (aproximadamente entre 100 eV a 100 keV). A emissão de raios-X pode ocorrer de três diferentes maneiras: desaceleração de partículas carregadas (elétrões, partículas carregadas e pesadas, como íons, prótons ou partículas α); indução de transições eletrônicas nas camadas internas dos átomos ou por decaimento de fontes radioativas [34].

Os raios-X são geralmente produzidos em laboratório, num tubo de raios-X, através do bombardeamento de um alvo com um feixe de elétrões de alta energia [35]. Devido à sua alta energia, têm a capacidade de ionizar matéria e de produzir danos biológicos.

Existem diversos processos através dos quais os fótons de raios-X interagem com a matéria, podendo ter diversos comportamentos com diferentes probabilidades: não interagirem de todo, serem completamente absorvidos pela matéria ou serem dispersos com ou sem perda de energia. No caso da presente dissertação a amostra em estudo é esmalte dentário e, para a energia a que será efetuado o estudo (50 keV), o processo predominante de interação dos raios-X com a matéria é o **efeito fotoelétrico**.

Quando um feixe de fótons de energia E , atravessa uma espessura x de um dado material, é submetido a uma atenuação exponencial devido a estes processos, descrita pela Lei de Lambert-Beer e que pode ser descrita pela equação 2.1 [36]:

$$I_x = I_0 e^{-\left(\frac{\mu}{\rho}\right)\rho x} \quad (2.1)$$

Onde: I_0 é o número de fótons incidentes no material; μ é o coeficiente de atenuação linear do material para uma determinada energia (cm^{-1}), ρ é a densidade do material (g/cm^3) e I_x é o número de fótons que emergem do material.

Efeito fotoelétrico

O efeito fotoelétrico, esquematizado na Figura 2.1, é um processo através do qual o átomo absorve toda a energia do fóton incidente. O fóton desaparece e a sua energia é utilizada para ejetar um elétron orbital. Este elétron passa a ser designado por fotoelétron e tem energia cinética igual à diferença de energias do fóton incidente e a energia de ligação da orbital da qual foi ejetado. A ejeção do elétron só ocorre se a energia do fóton exceder a energia de ligação da respetiva orbital e é tanto mais provável quanto mais próximas forem essas energias. Se esta condição se verificar, o elétron é ejetado criando uma lacuna na orbital, ionizando o átomo [36].

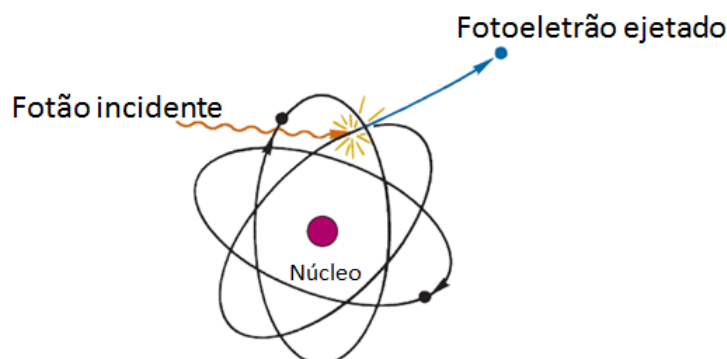


Figura 2.1: Representação do átomo na ocorrência do efeito fotoelétrico (Adaptado de ref. [36]).

De modo a voltar ao estado de menor energia, ocorre um rearranjo do cortejo eletrônico através da transferência de um elétron mais exterior para a lacuna criada anteriormente na camada mais interna, o que origina emissão de radiação X característica do átomo. Este processo denomina-se Fluorescência de raios-X (XRF).

Por outro lado, após a ionização de uma das camadas internas, o excesso energético do átomo pode causar a ejeção de um elétron de uma camada periférica, originando uma segunda ionização. Neste caso não ocorre emissão de radiação característica. Este fenômeno é designado de efeito de Auger e é predominante para materiais de baixo número atômico Z .

Dispersão

Dispersão é o processo de interação entre a radiação e a matéria que resulta numa mudança de direção da trajetória do fóton incidente. Os processos de dispersão podem ser elásticos ou inelásticos e não contribuem para a identificação da amostra estudada, além de que induzem o aumento do fundo do espectro [37].

Dispersão de Compton

A dispersão inelástica ou de Compton pode ser vista como uma colisão entre o fóton e um elétron de valência fracamente ligado. Neste processo, devido à energia do fóton exceder largamente a energia de ligação do elétron à orbital, a interação é vista como uma colisão entre um fóton e um elétron “livre”. Ao colidirem, o fóton cede parte da sua energia inicial e é defletido com um ângulo θ diferente do inicial, sendo parte da sua energia transferida para o elétron de recuo, como representado na Figura 2.2 [36]. Devido à fraca energia de ligação do elétron da camada exterior, este pode então ser ejetado, deixando assim o átomo ionizado.

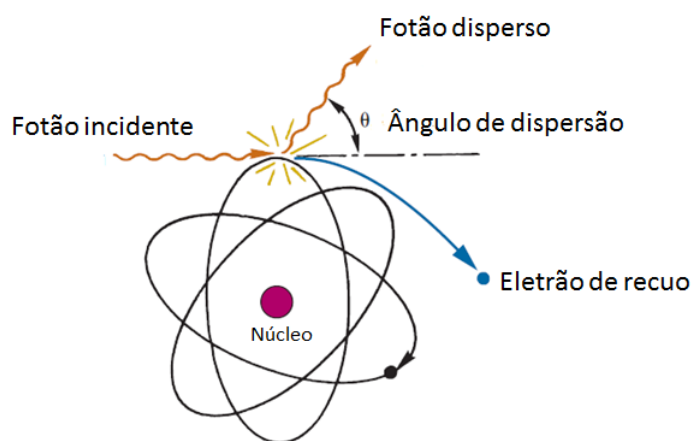


Figura 2.2: Representação do átomo na ocorrência da dispersão de Compton (Adaptado de ref. [36]).

Este efeito é mais provável para energias elevadas dos fótons incidentes e para materiais de baixo número atômico (Z) [38].

Dispersão de Rayleigh

A dispersão coerente ou de Rayleigh é um processo de interação que ocorre entre um fóton e um átomo como um todo. Neste processo, muito pouca energia é absorvida pelo átomo e o fóton é disperso sem perda de energia (dispersão elástica), não ocorrendo ionização do átomo.

Este efeito não é significativo em amostras biológicas uma vez que para elementos leves, como os que compõem maioritariamente os seus tecidos, a dispersão de Compton é predominante. Este fenómeno é mais relevante para baixas energias dos fótons incidentes ($\ll 50$ keV) e para materiais de elevado número atômico (Z) [38].

2.1.2 Produção de raios-X

O espectro resultante do bombardeamento de um alvo com um feixe de elétrons diz respeito à sobreposição de dois espectros: um contínuo, que depende apenas da energia dos elétrons de bombardeio (radiação de Bremsstrahlung), e um discreto que é característico do elemento alvo (radiação característica) [35].

A radiação contínua ou de Bremsstrahlung é originada pelos elétrons que, ao interagirem com os núcleos dos átomos do alvo, sofrem desaceleração e desvios na direção do seu movimento, originando uma emissão contínua de fótons de raios-X cuja energia pode ser calculada através da equação 2.2:

$$E = h\nu = K_i - K_f \quad (2.2)$$

Onde h corresponde à constante de *Planck*, de valor $4,14 \times 10^{-15}$ eV.s, ν corresponde à frequência da radiação e K_i e K_f representam, respectivamente, a energia cinética inicial e final do elétron. Vários fótons podem ser produzidos por este processo antes do elétron atingir o repouso [39].

A radiação discreta resulta da ionização das camadas mais internas dos átomos do alvo. Elétrons de camadas mais externas transitam para preencher as lacunas nas orbitais internas, emitindo fótons de energia característica do átomo alvo [35, 39].

2.1.3 Fluorescência de raios-X – Princípios Físicos

A espectroscopia por XRF é uma técnica não destrutiva de análise qualitativa e quantitativa de elementos em vários tipos de amostras.

Os princípios físicos da fluorescência de raios-X assentam na indução de transições eletrônicas entre as orbitais mais internas dos átomos, através do bombardeamento das amostras com fótons de raios-X (Figura 2.3). Estas transições resultam na emissão de radiação de fluorescência de raios-X de energia característica e independente da ligação química do átomo, permitindo a sua identificação e quantificação da sua concentração na amostra em estudo [40]. Mais especificamente, a energia da radiação de fluorescência identifica o elemento, enquanto que a sua intensidade (número de raios-X emitidos por unidade de tempo) permite que seja medida a sua concentração na amostra analisada [41].

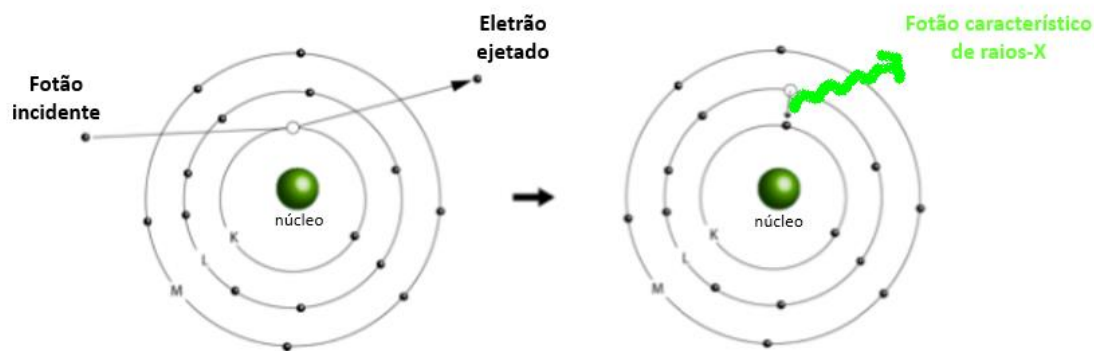


Figura 2.3: Representação do átomo na ocorrência de emissão de fluorescência de raios-X.

Esta técnica possibilita a detecção simultânea de vários elementos em baixas concentrações, tornando-se uma boa ferramenta para analisar o conteúdo de elementos traço em amostras de tecido biológico [42].

2.1.4 Fluorescência de raios-X dispersiva em energia

Um sistema de espectroscopia de EDXRF necessita de uma fonte de raios-X (geralmente um tubo de raios-X), um detetor de radiação X e um sistema de aquisição de dados [43].

Durante a análise e após a amostra ser excitada, a radiação X fluorescente emitida pela amostra é detectada por um detector semicondutor, normalmente de silício, e convertida em pulsos eletrônicos cuja altura é proporcional às respectivas energias. Os pulsos são amplificados e posteriormente enviados para o analisador multi-canal, onde cada canal corresponde a uma determinada energia. As contagens acumuladas em cada canal são convertidas na intensidade dos raios-X, e o *output* final resulta num espectro de raios-X de intensidade em função da energia [39].

Em suma, na Tabela 2.1, podem ser destacadas algumas das vantagens e limitações inerentes a esta técnica [37, 41, 44].

Tabela 2.1: Vantagens e limitações associadas à técnica de EDXRF

Vantagens	Limitações
Técnica não destrutiva o que permite estudos <i>self-control</i> ;	Dificuldades na detecção de elementos de baixo número atômico ($Z < 13$);
Deteção simultânea de diferentes elementos;	Não efetua distinção entre diferentes espécies do mesmo elemento.
Técnica económica, de fácil utilização e passível de instrumentação portátil;	
Análises rápidas, independentemente do tamanho da amostra;	

μ -Fluorescência de raios-X dispersiva em energia

Devido ao tamanho reduzido e superfície irregular dos espécimes que se pretendem analisar, assim como os tipos de estudo que se pretendem efetuar (variação elementar superficial e profundidade de desmineralização), recorreu-se à análise com micro-feixe.

O uso de micro-feixe neste estudo é bastante importante uma vez que aumenta a intensidade de radiação que chega à amostra no ponto focal, permitindo uma melhor focalização da área/ponto de análise e fornecendo informação pormenorizada sobre a distribuição dos elementos *major*, *minor* e de traço presentes na amostra [45].

Este detalhe da EDXRF é conseguido com recurso a lentes policapilares que coletam os fótons de raios-X divergentes provenientes do tubo e os redirecionam, através de múltiplas reflexões totais, originando feixes com *spot* de análise de diâmetro de dezenas de μm [37].

Na Figura 2.4 encontra-se representada a configuração de um sistema de medição de μ -EDXRF.

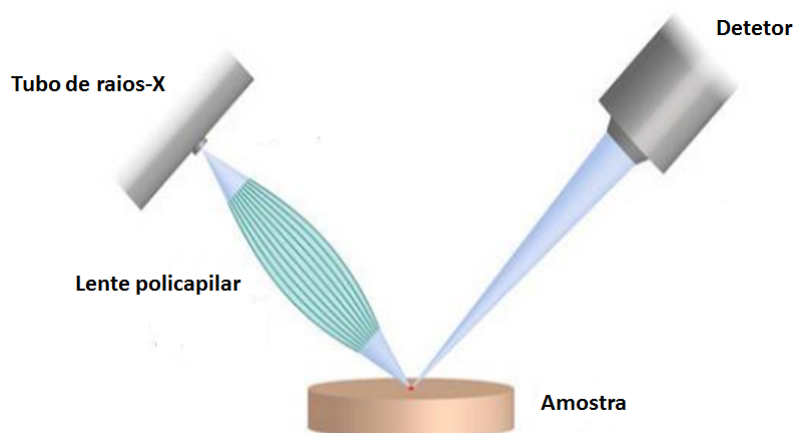


Figura 2.4: Esquema representativo dos componentes principais de um espectrómetro de μ -EDXRF: tubo de raios-X, lente policapilar, amostra e detetor (Adaptado de ref. [40]).

Fluorescência de raios-X dispersiva em energia com geometria triaxial

Num sistema de EDXRF com esta geometria, o tubo de raios-X, um alvo secundário e a amostra estão dispostos segundo uma geometria triaxial. Esta configuração geométrica permite formar três eixos ortogonais entre as direcções dos raios-X emitidos pelo tubo (feixe primário), pelo alvo secundário (feixe secundário) e pela amostra, tal como se pode observar na Figura 2.5 [46].

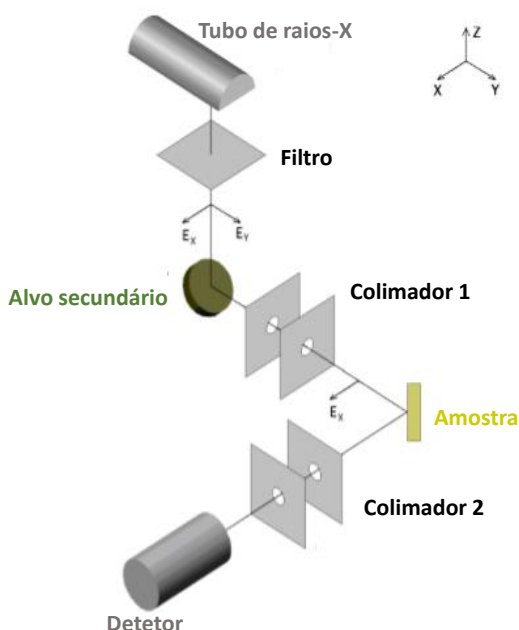


Figura 2.5: Esquema representativo da geometria triaxial (Adaptado de ref. [34]).

A utilização deste tipo de montagem tem como objetivo diminuir a radiação de fundo Bremsstrahlung, aproveitando o efeito da polarização do feixe primário, proveniente do tubo de raios-X [46].

O tubo de raios-X não emite radiação polarizada e sendo o eixo dos ZZ a direcção de incidência do feixe, o campo eléctrico vibrará no plano XY. Quando o feixe incide no alvo secundário, que funciona como polarizador, os electrões vão vibrar segundo as direcções do plano XY. A radiação difundida pelo alvo secundário na direcção do eixo YY só tem componente do campo eléctrico segundo o eixo dos XX, sendo absorvida a componente em YY. Assim, tem-se a polarização linear da radiação e quase nenhuma radiação Bremsstrahlung do tubo interagirá com o detector, o que melhora muito a relação sinal-ruído. Para tal, é necessário que a radiação seja consecutivamente dispersa segundo um angulo de, exactamente, $\frac{\pi}{2}$ em relação ao plano de dispersão anterior, pelo que o detetor deve ser

colocado perpendicularmente em relação aos feixes primário e secundário [34].

Esta geometria também diminui a intensidade da radiação de fundo porque a radiação dispersa por dispersão de Compton é mínima para um ângulo de difusão de $\frac{\pi}{2}$, o que diminui a intensidade da radiação do feixe secundário que chega ao detetor [34].

Tanto o feixe emitido pelo alvo secundário como pela amostra são colimados através de duas aberturas de prata, a fim de reduzir a radiação dispersa e melhorar os limites de detecção [46].

2.1.5 Artefactos espectrais

Num espectro resultante de uma análise por EDXRF, para além dos picos característicos dos elementos que compõem a amostra em estudo e do fundo (derivado da dispersão elástica e inelástica), podem surgir artefactos que são provocados pela interação da radiação com o detetor ou com a amostra. São eles os **picos soma**, os **picos de escape** e os **picos de difracção**.

Quando ocorrem eventos fotoelétricos no interior do detetor, os raios-X característicos do material do detetor são reabsorvidos e contribuem para o pico de energia total. No entanto, para eventos que ocorrem perto da superfície, há uma probabilidade significativa de que o raio-X característico escape e a quantidade de energia correspondente seja perdida do sinal. No caso dos detectores de silício (Si), o **pico de escape** terá a energia do pico original menos 1,74 keV (energia característica da $K\alpha$ do Si) [47].

No caso desta dissertação, o pico de escape no estudo de esmalte dentário, rico em cálcio ($E_{K\alpha}(\text{Ca}) = 3,69 \text{ keV}$) e fósforo ($E_{K\alpha}(\text{P}) = 2,02 \text{ keV}$), toma especial relevância. Em espécimes com elevada quantidade de Ca, o seu pico de escape pode coincidir com o pico de P (equação 2.3).

$$E_{pe}(\text{Ca}) = 3,69 - 1,74 = 1,95 \text{ keV} \quad (2.3)$$

Sendo as energias do pico de escape do Ca e do pico de P muito próximas, com diferença menor à capacidade de resolução do detetor, é necessário um bom *software* de desconvolução de espectros para conseguir separar estes dois picos.

Os **picos soma** surgem de uma forma específica de acumulação de picos, onde dois fótons de alta intensidade chegam ao detetor quase simultaneamente. Nestes casos, o detetor não consegue reconhecê-los como dois eventos distintos no tempo e os dois sinais são vistos como um, sendo a sua energia registada como a soma das duas energias. Estes

eventos são mais prováveis para fótons correspondentes a picos de alta intensidade [47].

O **pico de difração** surge quando a amostra em estudo possui uma qualquer estrutura cristalina que irá provocar a dispersão do feixe de raios-X proveniente do tubo, posteriormente coletados pelo detetor [48].

2.2 Espetroscopia Raman

A espectroscopia Raman é um método analítico versátil para análise de estruturas moleculares e da composição de materiais orgânicos e inorgânicos.

Esta técnica baseia-se na dispersão de radiação monocromática quando irradiada sobre uma amostra, no caso deste estudo é a HA de esmalte. Desta interação resultam alterações nos níveis vibracionais das moléculas, que podem ser detetados e as moléculas identificadas.

Através da espectroscopia Raman é possível identificar as bandas vibracionais de materiais biológicos e sintéticos. Como as bandas de Raman têm posições específicas para determinados grupos químicos, os espectros Raman podem ser usados para identificação química e quantificação. As análises qualitativas são executadas através da medição do número de onda da radiação dispersa pela amostra, enquanto que as análises quantitativas se baseiam na medição das intensidades da radiação dispersa [49, 50].

2.2.1 Raman – Princípios Físicos

Quando uma amostra é irradiada com radiação eletromagnética de energia $E = h\nu$, esta pode ser transmitida, absorvida e/ou dispersa. Devido à interação dos fótons com a molécula esta fica polarizada, *i.e.*, ocorre deformação da sua nuvem eletrônica devido à interação com um campo externo, e transita para um estado de energia virtual. Este estado não é estável e os fótons são rapidamente reemitidos [51]. Este fenómeno pode ocorrer segundo dois mecanismos distintos - dispersão de Rayleigh e **efeito de Raman**.

Na dispersão de Rayleigh, após a interação fótons-molécula, ocorre dispersão dos fótons incidentes em todas as direções. Este fenómeno pode ser visto como uma colisão elástica entre os fótons incidentes e a molécula e visto que a energia rotacional e vibracional da molécula não sofre alterações, a energia e a frequência do fóton disperso, ν_s , mantém-se igual à do fóton incidente, ν_i [52].

Por sua vez, o **efeito Raman** pode ser visto como uma colisão inelástica entre o fóton incidente e a molécula, ocorrendo variação da energia vibracional ou rotacional da molécula, ΔE_m . De modo a respeitar o princípio da conservação da energia, a energia do fóton disperso, $h\nu_s$, deve ser diferente da energia do fóton incidente, $h\nu_i$, como descrito na equação 2.4:

$$h\nu_i - h\nu_s = \Delta E_m \quad (2.4)$$

Apenas uma pequena percentagem da radiação incidente (aproximadamente 10^{-5}) é dispersa segundo o efeito de Raman. Este tipo de dispersão é muito menos provável de ocorrer comparativamente à dispersão de Rayleigh [52].

Relativamente ao efeito de Raman dois processos distintos podem ocorrer: dispersão Stokes e dispersão anti-Stokes [47].

Se a molécula se encontra inicialmente no estado fundamental, a interação fóton-molécula provoca um ganho de energia ($\Delta E_m > 0$ e $\nu_i > \nu_s$) e, neste caso, estamos perante um fenómeno de dispersão de Stokes, do qual resultam as linhas de Stokes no espectro de Raman. Por outro lado, se a molécula já se encontra inicialmente num estado excitado, após a interação com os fótons pode voltar ao seu estado fundamental. Este processo envolve transferência de energia para os fótons dispersos, originando emissão de fótons mais energéticos que os fótons incidentes ($\Delta E_m < 0$ e $\nu_s > \nu_i$), dando origem às linhas anti-Stokes no espectro de Raman [51, 52]. As linhas Stokes e anti-Stokes estão representadas na Figura 2.6.

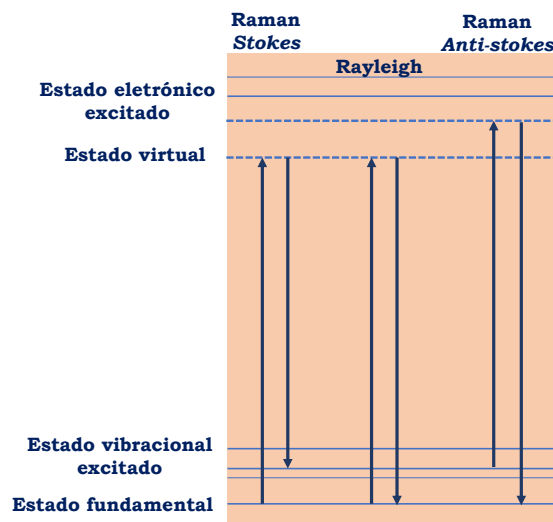


Figura 2.6: Diagrama dos níveis de energia: representação dos estados envolvidos num sinal de Raman (Adaptado de ref. [47]).

Visto que, à temperatura ambiente, a maior parte das moléculas se encontram no seu estado fundamental, as linhas de Stokes apresentam-se mais intensas relativamente às linhas anti-Stokes [47].

Nem todos os estados vibracionais são detetados pela espectroscopia Raman, apenas aqueles que causam alterações na polarizabilidade da molécula. O espectro de Raman, representado na Figura 2.7, apresenta no eixo das abcissas o deslocamento de Raman (Raman *shift*) que representa a diferença entre o número de onda da radiação incidente e dispersa, sendo a unidade convencionalmente expressa em número de onda (cm^{-1}), e no eixo das ordenadas a intensidade espectral, expressa em unidades arbitrárias u.a. dependentes dos parâmetros experimentais.

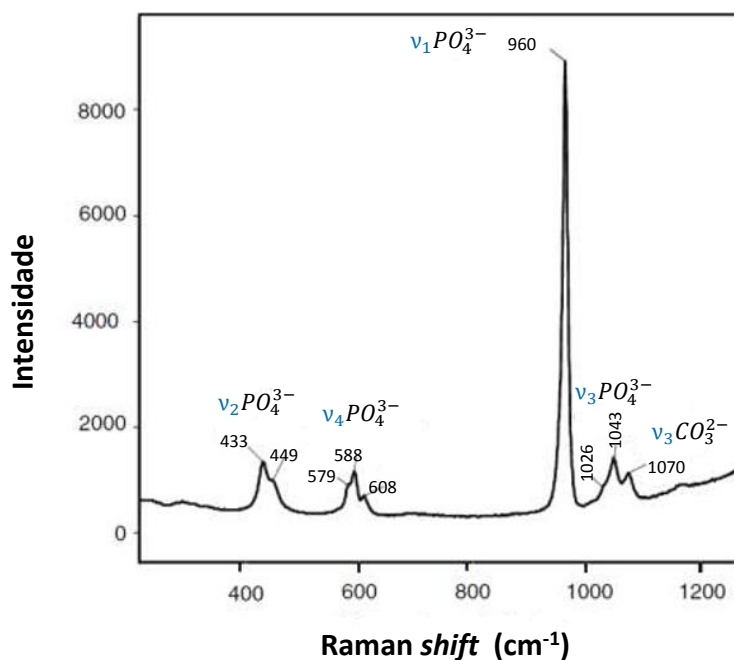


Figura 2.7: Espectro Raman da matriz de HA do esmalte (Adaptado de ref. [53]).

2.2.2 Fluorescência nos espectros Raman

Como no caso da presente dissertação, a técnica de Raman é bastante utilizada em investigações na área odontológica, mas uma das suas maiores limitações é a fluorescência exibida pela maioria dos materiais biológicos quando irradiados por luz laser.

Em contraste com o efeito Raman, a fluorescência refere-se a um processo de absorção, sendo aproximadamente 10^7 vezes mais intenso do que o efeito Raman, dificultando a análise do espectro [47].

O uso de sistemas confocais e de lasers de excitação de comprimentos de onda (λ) mais longos permitem minimizar o fundo provocado pela fluorescência. A diminuição da energia do laser de excitação (maior $\lambda_{exc} \rightarrow$ menor E) garante um aumento na diferença entre o nível virtual de energia e o nível eletrónico excitado, reduzindo as transições eletrónicas, especialmente para a matéria orgânica, e diminuindo o sinal de fundo. Porém, para além da fluorescência, também a intensidade do efeito Raman é reduzida (proporcional a λ_{exc}^{-4}) [37].

2.2.3 Espectroscopia μ -Raman confocal

Visto que uma das características inerentes ao sinal de Raman é o facto de ser um sinal muito fraco, o feixe de laser deve ser focalizado corretamente sobre a amostra em estudo e a radiação dispersa recolhida de forma eficiente. Estes requisitos são, geralmente, satisfeitos através do acoplamento de um microscópio ótico tradicional ao espectrómetro de Raman. Deste modo é conseguida uma visualização ampliada da amostra e uma análise de Raman em áreas microscópicas [47].

Na microscopia confocal de Raman, uma fonte de luz pontual é focalizada, através de uma objetiva, sobre a amostra e apenas os fotões provenientes do plano focal atingem o detetor. Os microscópios confocais de Raman apresentam uma abertura (*pinhole*) situada antes da fenda de entrada do monocromador. A radiação dispersa pela amostra atravessa novamente a objetiva do microscópio, sendo direcionada para um filtro onde os fotões de Rayleigh são eliminados. Por sua vez, os fotões dispersos segundo o efeito de Raman são direcionados para o *pinhole*, redirecionados para a fenda de entrada do monocromador e, seguidamente, para o espectrómetro chegando, por fim, ao detetor. Diferentes aberturas do *pinhole* podem ser usadas para controlar o grau de confocalidade, enquanto que a fenda de entrada é usada para controlar a resolução espectral [47, 54].

Na Figura 2.8 encontra-se uma representação da microscopia confocal de Raman.

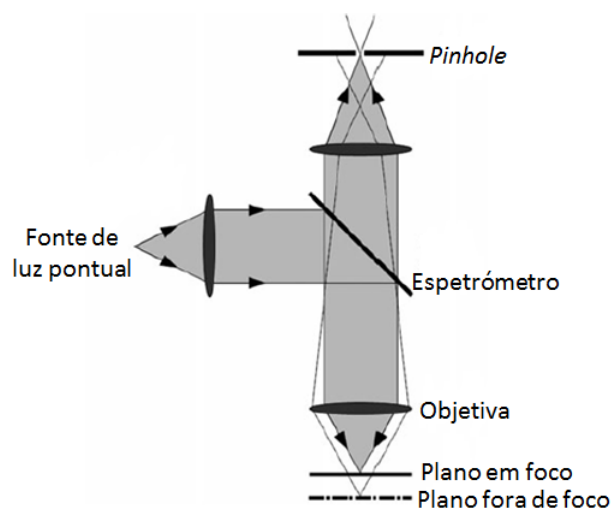


Figura 2.8: Representação da espectroscopia μ -Raman confocal: fonte de luz, objetiva, abertura *pinhole* e espectralímetro (Adaptado de [54]).

A Tabela 2.2 resume algumas das vantagens e limitações da espectroscopia μ -Raman confocal [37, 55].

Tabela 2.2: Vantagens e limitações associadas à técnica μ -Raman confocal

Vantagens	Limitações
Técnica não invasiva e não destrutiva;	Fluorescência.
Análise rápida de amostras sem preparação prévia;	
Resposta linear à concentração mineral;	
Elevada precisão e resolução espacial;	
Não necessita de vácuo;	

3 | Materiais e Métodos

Este estudo foi realizado em colaboração com o Grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (GIBBO-LibPhys da FMDUL), que disponibilizou os espécimes utilizados e todas as condições necessárias à sua preparação e execução do protocolo de ciclos erosivos. Os diferentes grupos de espécimes foram analisados por duas técnicas: EDXRF e μ -Raman Confocal. De seguida é descrito todo o tratamento dos espécimes, desde a sua recolha e execução dos ciclos erosivos até a forma como se procedeu à sua posterior análise qualitativa e quantitativa.

3.1 Preparação dos espécimes - seleção, corte e categorização

Para o estudo realizado foram utilizados dentes humanos hígidos (prémolares e molares), extraídos por doença periodontal ou por motivos ortodônticos e conservados no banco de dentes do GIBBO-LibPhys da FMDUL em solução de Cloramina a 0,5% a 4 °C. De forma a verificar se as amostras possuíam irregularidades, estas foram observadas em detalhe numa lupa binocular (Meiji Techno EMZ 8RT, Japan). Caso possuíssem qualquer tipo de irregularidade, seriam rejeitadas e substituídas. Após a sua seleção foram cortadas com recurso a uma lâmina de precisão (Isomet 1000, Buehler, EUA). Na Figura 3.1 encontra-se uma fotografia da lâmina utilizada.

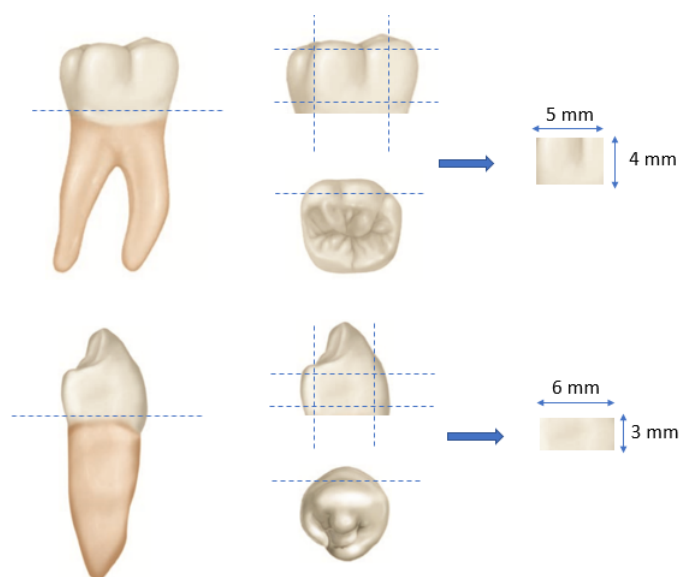


Figura 3.1: Fotografia da máquina de corte com lâmina de precisão utilizada no corte dos espécimes.

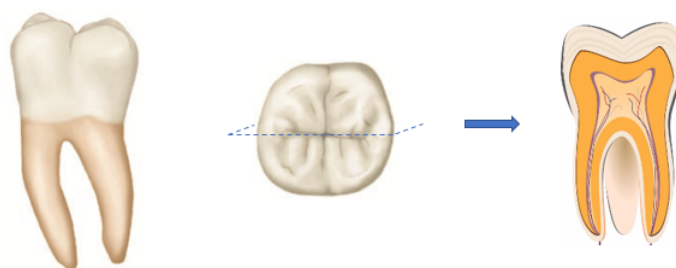
Como representado na Figura 3.2, os dentes foram cortados segundo duas sequências de corte distintas, obtendo-se espécimes apenas de superfície de esmalte e espécimes em perfil.

No total, foram preparados 27 espécimes que foram distribuídos por frascos devidamente identificados e conservados numa solução de Cloramina 0,5% a 4 °C até ao início do estudo. Os espécimes foram divididos em 4 grupos de acordo com o tipo de análise realizada e técnica analítica utilizada, como apresentado na tabela 3.1.

3.1. PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES - SELEÇÃO, CORTE E CATEGORIZAÇÃO



a Sequência de corte para obtenção de espécimes de superfície de esmalte.



b Sequência de corte para obtenção de espécimes em perfil.

Figura 3.2: Ilustração das sequências de corte realizadas para obtenção dos espécimes (Adaptado de ref. [56]).

Tabela 3.1: Categorização dos diferentes grupos de espécimes por tipo de análise realizada e técnica analítica utilizada

Grupo	Tipo de análise	Técnica analítica
$T_1 - T_7$ (<i>estudo self-control</i>)	Análise em superfície e em perfil	μ -EDXRF
$S_1 - S_9$ (<i>estudo self-control</i>)	Análise em superfície	EDXRF com geometria triaxial e μ -Raman confocal
$A_1 - E_1$ (grupo controle) $A_2 - E_2$ (grupo experimental)	Análise em perfil	μ -Raman confocal

3.2 Protocolo experimental de ciclos erosivos - modelo *in vitro*

O presente protocolo de ciclos erosivos pretendeu simular a ação do consumo abusivo de refrigerantes, nomeadamente a Coca-Cola® (pH = 2,43) sobre a superfície de esmalte dentário. O protocolo executado consistiu em 3 ciclos erosivos diários, durante um total de 10 dias, em que cada ciclo representa o consumo de uma Coca-Cola® (potencial erosivo).

Como ilustrado no diagrama da Figura 3.3, cada ciclo consistiu na submersão dos espécimes 1 minuto em Coca-Cola®, seguido de 5 minutos em saliva artificial por forma a simular um golo de bebida. Este processo foi repetido 5 vezes, até perfazer um total de 30 minutos. Entre ciclos, intervalados de 2:30 h, e durante a noite os espécimes foram conservados em saliva artificial. Ao fim dos 10 dias de ciclos, os espécimes foram conservados em solução de Cloramina 0,5% a 4 °C para posterior análise elementar.

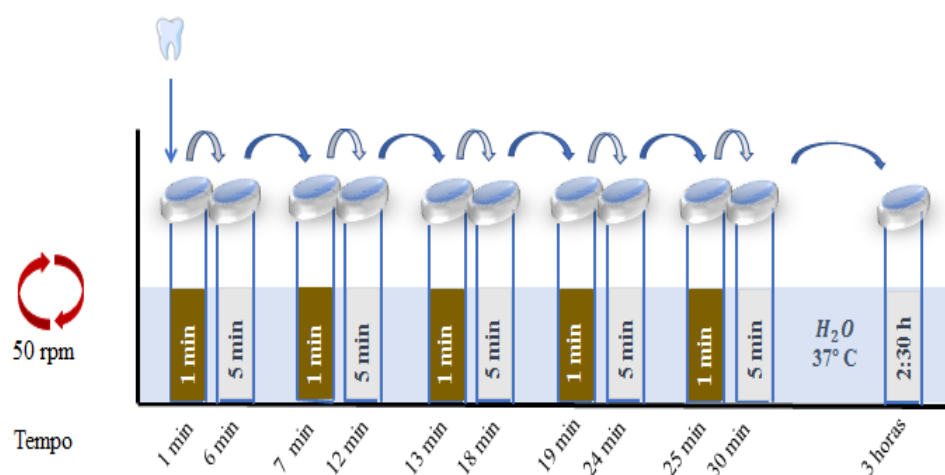


Figura 3.3: Ilustração do modelo *in vitro* e do ciclo erosivo executado no protocolo experimental de ciclos erosivos desenvolvido para simulação do consumo abusivo do refrigerante.

O modelo *in vitro* utilizado visou reproduzir tanto quanto possível as condições intraorais reais. Para além do uso da saliva artificial, os ciclos foram executados em banho a 37 °C e com agitação automática mínima de 50 rpm, de modo a simular condições de temperatura média e humidade intraorais, e também possíveis movimentos naturais que possam ocorrer dentro da boca.

3.2.1 Preparação da solução de saliva artificial

A solução de saliva artificial utilizada neste estudo foi a SAGF (*Artificial Saliva Gal Fovet*), uma saliva artificial apenas com componentes inorgânicos. A sua composição encontra-se descrita na Tabela 3.2 [57].

Tabela 3.2: Massa de reagentes para preparação de 1 L de SAGF

Reagente	Massa (g±0,0001)
NaCl	0,1256
KCl	0,9639
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2278
KH ₂ PO ₄	0,6545
Ureia	0,200
NH ₄ Cl	0,178
NaHCO ₃	0,6308
KSCN	0,1892
Na · 2SO ₄ · 10H ₂ O	0,7632

Para preparar 1 L de SAGF adicionou-se a um balão volumétrico de um litro, 500 mL de água destilada e um magneto. De seguida foram adicionados os reagentes e por fim foi adicionada água destilada até perfazer 1 L. Durante todo o processo de preparação foi utilizada uma placa de agitação a velocidade de 400 rpm para garantir a homogeneidade da solução. O intervalo de pH desta solução ([6,8;7,8]) foi sempre respeitado.

3.2.2 Medição do pH da Coca-Cola®

O pH da Coca-Cola® foi medido com recurso a um medidor de pH de laboratório (GLP 21, CRISON) de alta gama disponível no laboratório do GIBBO.

O procedimento seguido na medição de pH consistiu nos seguintes passos: calibração do eletrodo com as três soluções tampão de pH 4,01, 7,00 e 9,21, respetivamente. Seguidamente fizeram-se 3 medições por estabilidade de pH da solução, resultando o valor final da média aritmética das 3 medições efetuadas (equação 3.1).

$$pH_{Coca-Cola} = \frac{2,44 + 2,43 + 2,42}{3} = 2,43 \pm 0,02 \quad (3.1)$$

A incerteza apresentada foi obtida através da Lei da Propagação das Incertezas considerando a incerteza da distribuição (desvio à média) e do aparelho de medição.

3.3 Análise por EDXRF

3.3.1 Equipamento de μ -EDXRF

Neste estudo utilizou-se o equipamento M4 TornadoTM Bruker (Alemanha). O material do ânodo do tubo de raios-X deste espectrómetro é de Rh (ródio), o tubo funciona a uma tensão máxima de 50 kV com uma potência máxima de 30 W e está equipado com 5 filtros. O espectrómetro apresenta ainda uma estrutura policapilar que permite um feixe focado na amostra com um diâmetro de 25 μm para o Mo-K α . Com este aparelho pode-se ainda efetuar análises numa atmosfera de vácuo (~ 20 mBar).

Em cada aquisição, o tubo de raios-X foi operado a 50 kV e 300 μA , sendo utilizado um filtro de 12,5 μm de Alumínio com o objetivo de reduzir a radiação de *Bremsstrahlung* proveniente do tubo, na região das baixas energias. As análises foram realizadas em vácuo de forma a evitar a atenuação da radiação característica dos elementos mais leves pelo ar. Para a deteção da radiação de fluorescência recorreu-se a um detetor de Silício (*silicon drift detector* – SDD) arrefecido termoeletricamente, com uma resolução de energia de 142 eV para Mn-K α e uma área sensível de 30 mm^2 .

3.3.1.1 Análise em superfície

Neste estudo foi analisado o grupo de espécimes $T_1 - T_7$.

Para a realização das medições, os espécimes foram fixados numa caixa de *petri* com recurso a fita de carbono. A análise em superfície consistiu em realizar o mapeamento de 2 áreas na superfície de esmalte de cada espécime. Optou-se por fazer análise em mapeamento (em vez de análise pontual) porque um mapa engloba uma área mais representativa da concentração dos elementos presentes na amostra do que a análise pontual e facilita a reprodução das análises em medições posteriores, minimizando o fator de heterogeneidade dos espécimes.

As condições de aquisição de cada mapeamento encontram-se descritas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições experimentais de aquisição dos mapeamentos na análise em superfície.

Parâmetro	Aquisição
Tempo/pixel	8,5 ms
Número de ciclos	10
Modo	<i>Serpentine</i>
Passo	25 μm

Método de quantificação

A análise quantitativa foi realizada com o objetivo de determinar a concentração dos elementos presentes nos espécimes em estudo. Após a aquisição, procedeu-se à desconvolução dos espectros, ao ajuste e à quantificação utilizando o *software* Mquant do M4 Tornado. A quantificação fornecida é baseada no método dos parâmetros fundamentais considerando a matriz de hidroxiapatite - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A equação dos parâmetros fundamentais relaciona a intensidade do pico de determinado elemento com a concentração desse elemento na amostra segundo a equação 3.2 [58]:

$$I_i = I_0 k_i A_i m c_i \quad (3.2)$$

Onde,

I_i é a intensidade da radiação X característica do elemento i ;

I_0 corresponde à intensidade inicial da radiação;

k_i é um fator de calibração experimental;

A_i é um fator de atenuação na amostra;

m é a massa da amostra por unidade de área expressa em g/cm^2 ;

c_i é a concentração do elemento i .

Este programa faz o ajuste do pico do Ca e assume a intensidade do pico do P em função da estequiometria da fórmula química. Deste modo, a razão Ca/P é constante. Para avaliar a precisão do método quantitativo utilizado foram feitas medições em amostras certificadas de osso, por se tratar da matriz disponível mais semelhante às amostras em estudo. Utilizaram-se *Bone ash* (National Institute of Standards and Technology SRM 1400) e *Caprine Bone* (New York State Department of Health RM05-04). Os valores obtidos, assim como os limites de detecção para NYS RM 05-04 *Caprine bone* encontram-se registados na Tabela 3.4 [59].

Tabela 3.4: Concentração obtida pelo *software* MQuant \pm incerteza para os materiais padrão *NIST SRM 1400 Bone ash* e *NYS RM 05-04 Caprine bone* e limites de detecção obtidos para *NYS RM 05-04 Caprine bone* (Adaptado de [59])

	<i>NIST SRM 1400 Bone ash</i>		Limites de Detecção	<i>NYS RM 05-04 Caprine bone</i>	
	Valor Obtido (% w/w)	Valor Certificado (% w/w)		Valor Obtido (% w/w)	Valor Certificado (% w/w)
P	17% \pm 2%	17,91% \pm 0,19%	2200	10% \pm 2%	12,5%
Ca	37% \pm 2%	38,28% \pm 0,13%	230	26% \pm 2%	26,4%
	Valor Obtido (μ g/g)	Valor Certificado (μ g/g)		Valor Obtido (μ g/g)	Valor Certificado (μ g/g)
Zn	220 \pm 30	181 \pm 3	20	90 \pm 10	81
Sr	240 \pm 10	249 \pm 7	7	140 \pm 20	150
Pb			3	38 \pm 5	31,5 \pm 0,7

3.3.1.2 Análise em perfil

Uma vez que neste estudo se pretendia uma análise em profundidade, os espécimes do grupo $T_1 - T_7$ foram novamente analisados, mas agora em perfil, tendo sido fixados com recurso a um preparado de cera com dióxido de titânio, TiO_2 , como apresentado na Figura 3.4. A escolha da cera como fixadora do espécime deveu-se, essencialmente, à sua reversibilidade para a montagem dos espécimes, possibilitando o estudo *self-control*. Por outro lado, a presença de titânio na cera e a sua inexistência no dente permitiu fazer uma clara distinção da fase de transição cera-dente.

Para a montagem dos espécimes foi necessário construir um suporte sem fundo e com uma abertura lateral que permitisse a montagem e posterior remoção do espécime da cera. Para tal, foram impressos 2 suportes em 3D no FabLab da FCT-UNL.



Figura 3.4: Fotografia de um espécime em perfil montado em cera.

A análise em perfil consistiu em realizar um mapeamento que englobasse a fronteira cera-dente, como ilustrado na Figura 3.5, de modo a conseguir seguir o perfil do Ti (cera), do Ca e do P (dente). Os parâmetros de aquisição de cada mapeamento estão descritos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Condições experimentais de aquisição dos mapeamentos na análise em profundidade.

Parâmetro	Aquisição
Tempo/pixel	4 ms
Número de ciclos	75
Modo	<i>Normal</i>
Passo	4 μm

Previamente ao início da execução do protocolo de ciclos erosivos foi aplicada uma camada de verniz na face interna dos espécimes, de modo a analisar o mesmo perfil (não exposto ao agente) analisado nas medições de controlo, garantindo assim que qualquer desmineralização causada pela Coca-Cola ocorreu apenas e só através da superfície de esmalte. No fim do protocolo a camada de verniz foi retirada e os espécimes foram novamente montados no preparado de cera e analisados.

A partir de cada mapeamento, ilustrado na Figura 3.6, traçaram-se diferentes linhas utilizando a ferramenta *line scan* do software *Sprit do M4 Tornado*. Seguidamente, recorrendo ao software de análise de dados e gráficos - *OriginPro* versão 8, calculou-se a derivada para cada elemento, obtendo-se a taxa de variação da intensidade de cada elemento em função da posição. De modo a facilitar a interpretação dos resultados foi aplicada uma função de *smoothing* (*average smooth*) a cada curva. Definiu-se o mínimo da derivada do Ti como referência para o início do dente e o máximo das derivadas de Ca e P como referência para o máximo de mineralização destes elementos no dente e, por fim, calculou-se a posição do máximo de mineralização, tendo como referência para a posição zero o mínimo da derivada de Ti. Espera-se que após o tratamento ocorra um deslocamento para a direita da posição do máximo de mineralização de Ca e de P no gráfico das derivadas.

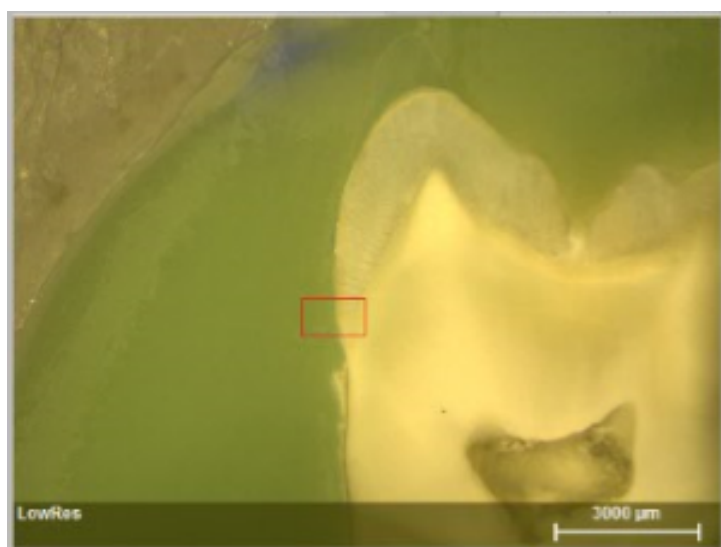


Figura 3.5: Imagem vídeo obtida pela câmara no interior do equipamento de μ -EDXRF onde está registada a área de mapeamento do espécime para a análise em perfil, com ampliação de 10x.

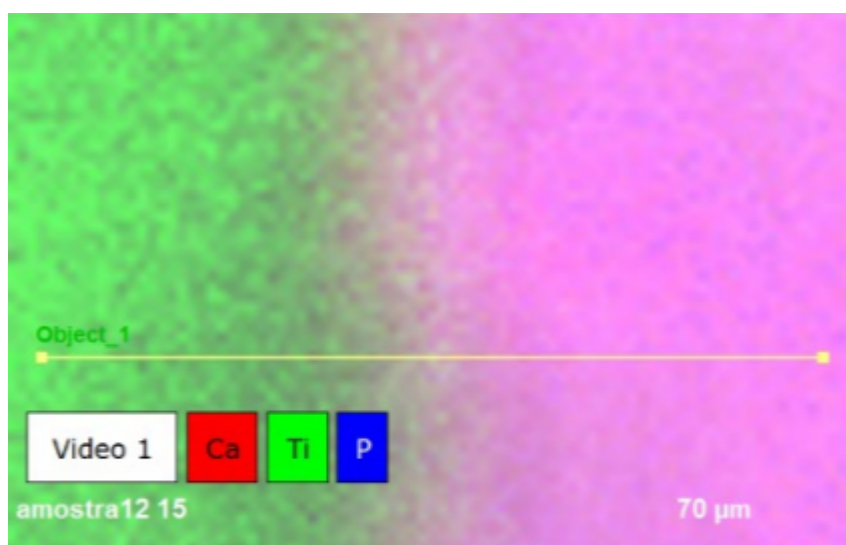
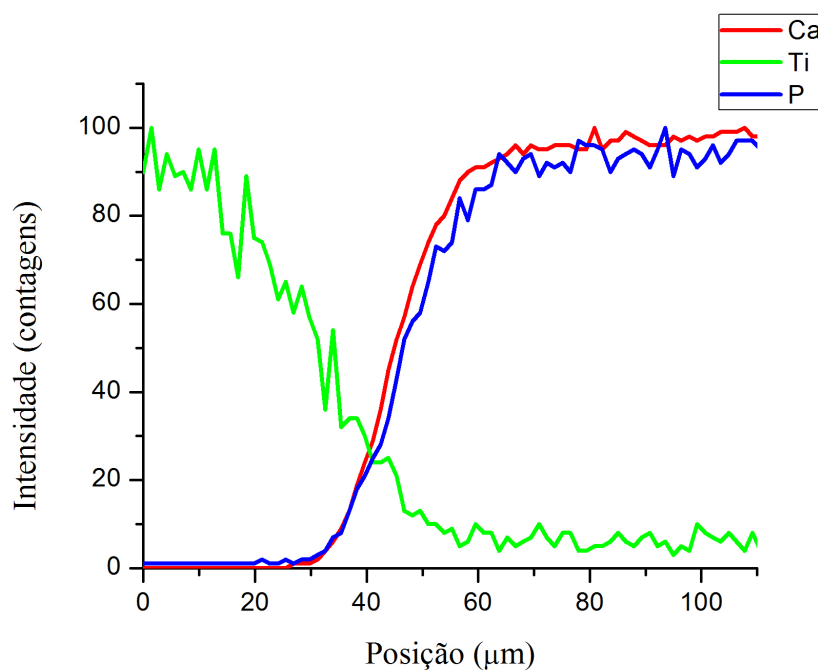
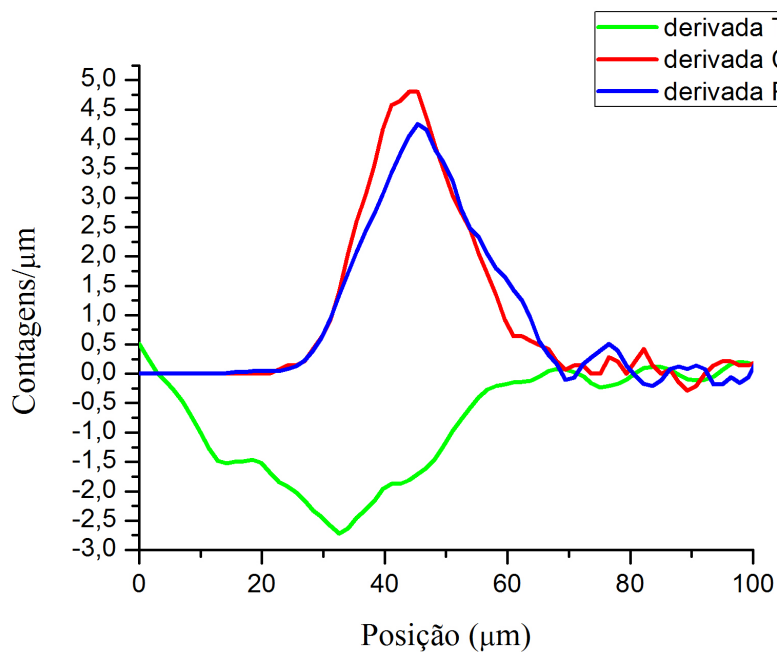


Figura 3.6: Imagem do mapeamento total obtido resultante da análise em perfil por μ -EDXRF.

A Figura 3.7 resume o tratamento de resultados acima descrito.



a Gráfico da variação da intensidade de cada elemento (Ca, Ti e P) em função da posição (*line scan*).



b Gráfico com a taxa de variação da intensidade de cada elemento (Ca, Ti e P) em função da posição.

Figura 3.7: Gráficos resultantes do tratamento dos resultados obtidos no estudo da profundidade de desmineralização por μ -EDXRF.

3.3.2 Análise em superfície por EDXRF com geometria triaxial

As dispersões de Compton e Rayleigh são dois processos de interação da radiação com a matéria e apresentam diferentes probabilidades de ocorrer, dependendo do número atômico efetivo (Z_{ef}) da amostra em estudo e da energia da radiação de incidência na amostra para análise. Assim, este estudo, pretendeu-se avaliar possíveis alterações do Z_{ef} dos espécimes em estudo, através da comparação dos picos da dispersão de Compton e Rayleigh no espectro de EDXRF, envidenciados na Figura 3.8. Para tal, recorreu-se ao cálculo da razão Rayleigh/Compton: razão entre os máximos de intensidade dos picos de dispersão de Rayleigh e de Compton do espectro de EDXRF, descrita na equação 3.3.

$$R/C = \frac{I_{Rayleigh(K\alpha Mo)}}{I_{Compton(K\alpha Mo)}} \quad (3.3)$$

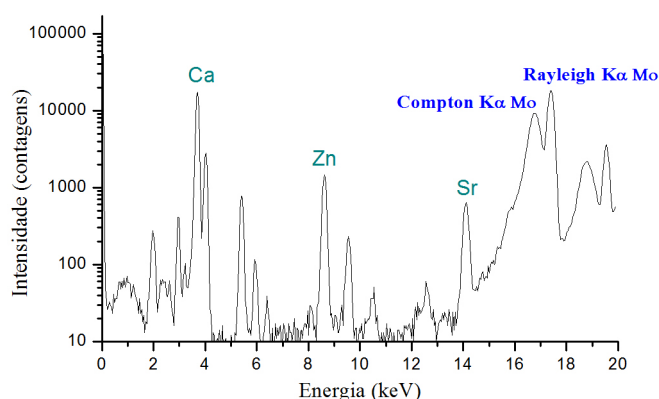


Figura 3.8: Espectro de EDXRF da superfície de esmalte obtido por análise com geometria triaxial. Identificação de alguns elementos constituintes da superfície de esmalte e dos picos de dispersão de Compton e Rayleigh para o Mo (material do alvo secundário).

O espectrómetro de EDXRF utilizado apresenta uma geometria triaxial entre o tubo de raios-X, o alvo secundário de Molibdénio (Mo) e a amostra. Durante as aquisições, o gerador de raios-X com ânodo de Tungsténio (W) foi operado a 50 kV e 20 mA e com um tempo de aquisição típico de 1000 s. A radiação característica foi detectada usando um detector Si(Li), com uma área ativa de 30 mm² e uma janela de berílio de 8 µm, com resolução de energia de 150 eV a 6,4 keV. Um colimador de prata foi colocado à frente do detector para restringir a sua área efetiva, excluindo a radiação proveniente das regiões próximas do bordo.

Neste estudo foi utilizado o grupo de espécimes $S_1 - S_9$.

Para a realização das medições, cada espécime foi fixado numa folha de *mylar* com recurso a fita de carbono, como representado na fotografia da Figura 3.9. Devido às irregularidades geométricas dos espécimes, o que influencia bastante a intensidade do pico de dispersão de Compton, cada espécime foi analisado em 4 posições diferentes: rodando 90° a partir da posição anterior do porta *slides* no suporte, de modo a padronizar as medições. O valor final para cada espécime resultou da média aritmética das 4 razões da intensidade dos picos Rayleigh/Compton.



Figura 3.9: Fotografia do espécime montado na folha de *mylar* para análise por EDXRF.

3.4 Análise por μ -Raman Confocal

3.4.1 Equipamento μ -Raman Confocal

Nas análises por μ -Raman Confocal, o espectrómetro confocal utilizado foi o μ -Raman XploRA (Horiba/Jobin-Yvon Xplora, França), equipamento com um microscópio Olympus com várias objetivas: 10x, 50x e 100x. A análise dos espectros centrou-se, essencialmente, na banda a $\sim 960\text{ cm}^{-1}$, correspondente à elongação simétrica ν_1 do grupo PO_4^{3-} , representada no espectro da Figura 3.10. Para o ajuste, correção da linha de base dos espectros adquiridos e cálculo do integral da banda em estudo recorreu-se ao *software* LabSpec versão 5.58.25 (Horiba/Jobin-Yvon Xplora, França).

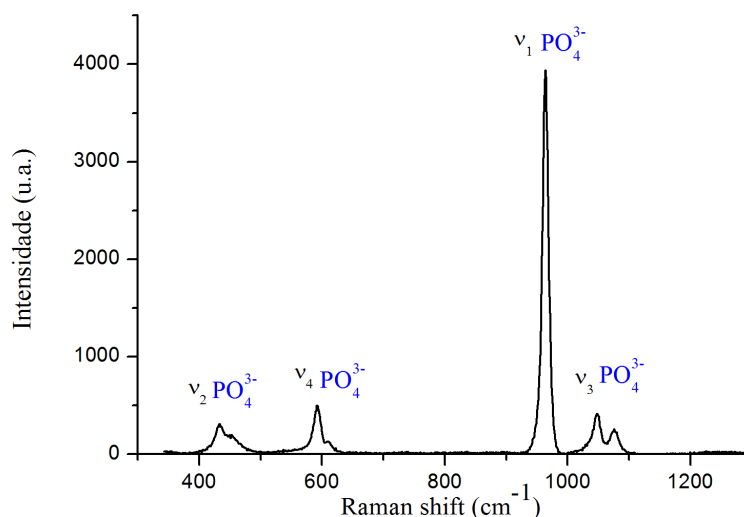


Figura 3.10: Espectro Raman com identificação dos modos de vibração do grupo fosfato (PO_4^{3-}) da HA de esmalte.

Para além da identificação das espécies químicas da amostra em estudo, a espectroscopia Raman fornece ainda informações sobre a orientação molecular e é utilizada para aferir experimentalmente a simetria das vibrações das ligações moleculares através do cálculo da razão de despolarização para um pico particular. Estas medições são feitas adquirindo espectros com polarização paralela ou perpendicular à polarização inerente do laser de excitação. A aquisição é feita inserindo um polarizador entre a amostra e o espectrómetro (polarizador analisador, PA), permitindo que a polarização Raman seja selecionada pelo utilizador [60].

De acordo com o estudo realizado por Ko *et al* [61], espectros de esmalte desmineralizado apresentam menor sensibilidade à polarização perpendicular entre o laser de excitação e a radiação dispersa pela amostra, comparativamente com os espectros de esmalte saudável. Assim, de modo a avaliar a desmineralização dentária, foi calculada a razão de despolarização (RD) para a elongação simétrica ν_1 do grupo PO_4^{3-} , de acordo com a equação 3.4:

$$RD_{960} = \frac{I_{(960)\perp}}{I_{(960)\parallel}} \quad (3.4)$$

Onde, $I_{(960)\perp}$ e $I_{(960)\parallel}$ são os integrais dos picos de intensidade da banda Raman a 960 cm^{-1} , referente ao alongamento simétrico ν_1 do grupo PO_4^{3-} , utilizando polarização perpendicular e paralela entre a radiação incidente e dispersa pela amostra, respetivamente.

A Figura 3.11 mostra um diagrama de como o ângulo (θ) entre o LP e o AP é determinado: através da rotação mecânica do *half-wave plate* (HWP).

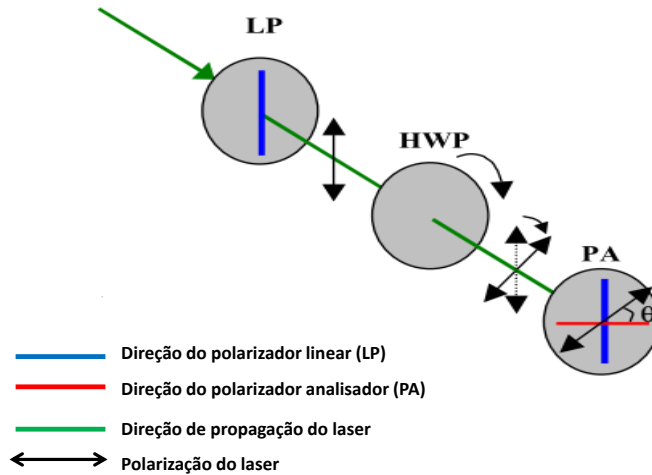


Figura 3.11: Esquema representativo do posicionamento dos polarizadores para determinação do ângulo (θ) entre a direção de polarização do laser de incidência na amostra e a direção do polarizador analisador (PA) (Adaptado de ref. [61]).

A título de exemplo, a Figura 3.12 ilustra as diferenças entre espectros de Raman adquiridos num espécime de esmalte saudável e no mesmo espécime desmineralizado, com as diferentes polarizações.

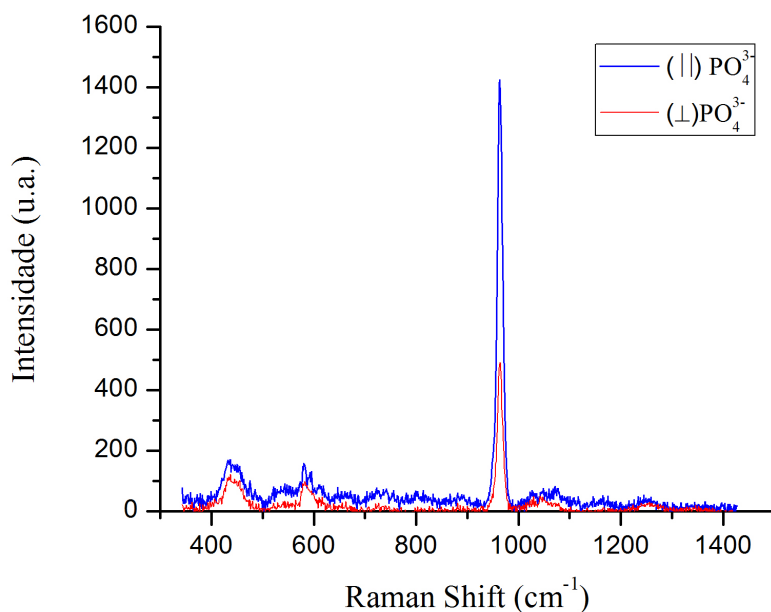
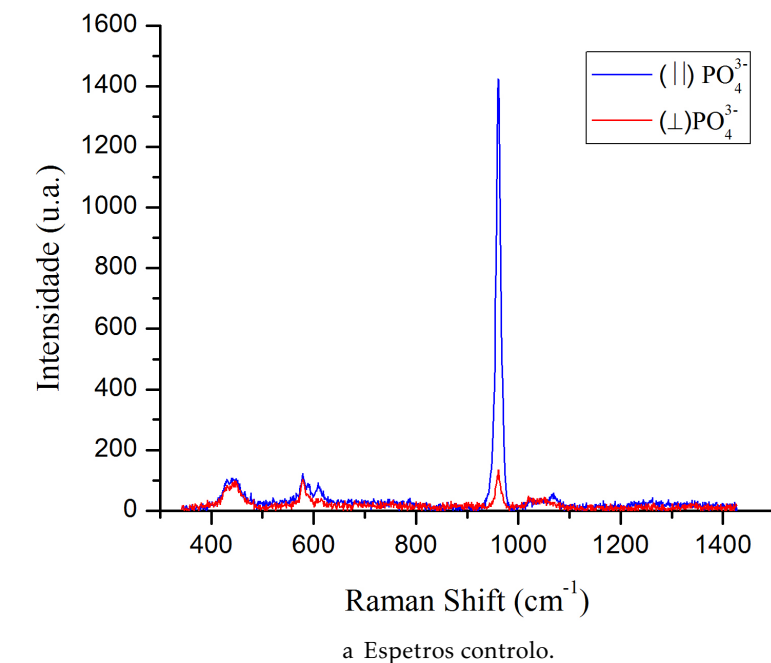


Figura 3.12: Comparação dos espectros de Raman da superfície de HA adquiridos com os polarizadores paralelos e perpendiculares entre si para o espécime S_4 . Nos espectros adquiridos após a execução dos ciclos erosivos (b) pode observar-se um aumento da intensidade $I_{(960)\perp}$, indicativo da diminuição da sensibilidade dos cristais a esta polarização.

3.4.2 Análise em superfície

O grupo de espécimes utilizado neste estudo foi, novamente, o grupo $S_1 - S_9$.

Para a realização das medições, os espécimes foram fixados numa caixa de *petri* com recurso a fita de carbono. Foram adquiridos 2 espetros em 5 pontos aleatórios por espécime: com a orientação dos polarizadores paralelos e perpendiculares entre si. Em cada ponto foi calculada a razão de despolarização (RD).

Os parâmetros de aquisição de cada espetro encontram-se descritos na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Condições experimentais de aquisição de um espetro na análise de μ -Raman em superfície.

Parâmetro	Aquisição
Laser	785 nm
Hole	300 μm
Slit	100 μm
Grating	1200 grooves/mm
Objetiva	100x
Filtro	50%
Tempo de exposição	10 s
Número de acumulações	5

3.4.3 Análise em perfil

Neste estudo foram utilizados o grupo controlo $A_1 - E_1$ e respetivo grupo experimental $A_2 - E_2$.

À semelhança do estudo da profundidade de desmineralização por μ -EDXRF, recorreu-se à montagem dos espécimes em perfil em cera com TiO_2 para análise em perfil. No entanto, aquando da visualização desta montagem ao microscópio de Raman, constatou-se que existia um *micro-gap* entre a cera e o dente o que, devido ao spot de análise desta técnica ser da ordem de grandeza do *gap* existente ($\sim 2 \mu\text{m}$) e ao passo de análise definido ($2 \mu\text{m}$), dificultou a aquisição de espetros na interface resina-dente não havendo nenhuma referência para o início do dente.

Assim, para este estudo foi necessário recorrer a outro material de montagem dos espécimes, e neste caso optou-se pela sua montagem em resina *epoxy*. Contudo, este material é de montagem irreversível (ao contrário da cera) o que impossibilitou o estudo *self-control*. De modo a ultrapassar esta dificuldade foram utilizados dois grupos - um de controlo ($A_1 - E_1$) e um experimental ($A_2 - E_2$), onde cada espécime do grupo controlo

tem o seu correspondente espécime do grupo experimental (metades do mesmo dente molar), o que minimiza a heterogeneidade entre espécimes.

Após o corte de cada molar, os espécimes do grupo controlo foram montados em resina *epoxy* para posterior análise, como representado na Figura 3.13. Por sua vez, os respetivos espécimes do grupo experimental foram primeiramente submetidos ao protocolo experimental de ciclos erosivos e só depois montados em resina e cortados transversalmente para análise em perfil, como ilustrado na Figura 3.14.



Figura 3.13: Fotografia do espécime controlo C_1 montado em resina.



a Espécime C_2 montado em resina epoxi.



b Corte transversal do espécime C_2 após montagem em resina *epoxy*.



c Superfície do espécime C_2 analisada.

Figura 3.14: Sequência de cortes para análise em perfil por μ -Raman Confocal após execução do protocolo de ciclos erosivos.

Durante a análise em perfil, para cada espécime de cada grupo, foram adquiridos 51 espectros ao longo de 3 linhas centradas na interface resina-esmalte. Cada espectro foi adquirido com polarização perpendicular e paralela entre o laser incidente no espécime e a radiação dispersa pelo espécime, respectivamente. Os parâmetros de aquisição de cada espectro estão descritos na Tabela 3.6.

Para cada linha, definiu-se o início de dente no primeiro espectro que já não apresentasse nenhum sinal de resina e, seguidamente, calculou-se a razão de despolarização (RD) ao longo resto da linha. Na Figura 3.15 encontra-se representada uma das linhas adquiridas neste estudo.

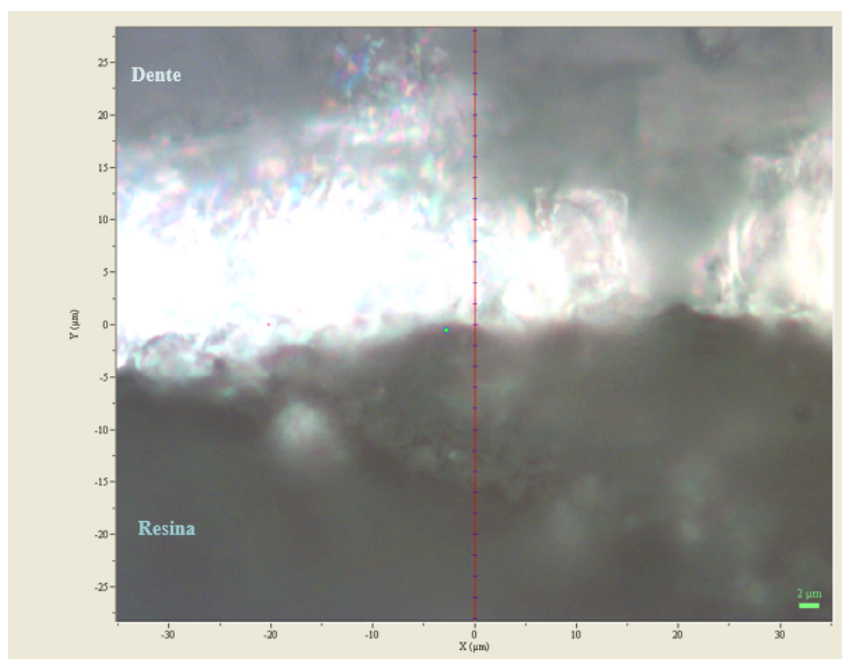


Figura 3.15: Imagem obtida pela lente objetiva do microscópio ótico de Raman, com ampliação de 100x, onde estão registadas as coordenadas da posição da linha no espécime para análise em perfil.

4 | Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados das medições realizadas. Os resultados estão divididos pelos diferentes tipos de técnica analítica (EDXRF e Raman) e tipo de estudo (estudo da desmineralização em superfície e da profundidade de desmineralização).

4.1 Estudo da desmineralização em superfície

4.1.1 Variação dos vários constituintes elementares – análise por μ -EDXRF

Neste estudo, para além dos elementos *major* cálcio (Ca) e fósforo (P) da matriz de HA, os seguintes elementos traço foram medidos e quantificados: estrôncio (Sr), enxofre (S), ferro (Fe) e zinco (Zn). Os elementos *major* hidrogénio (H) e oxigénio (O) não foram medidos devido à sensibilidade da tecnologia utilizada, que apenas permite a deteção de elementos com um número atómico superior a 13.

Os gráficos de barras apresentados nas Figuras 4.1 a 4.6 ilustram a comparação entre as concentrações dos elementos seguidos antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. As tabelas com os valores das concentrações elementares (w/w%) correspondentes a cada espécime e respetivos desvios-padrão encontram-se no apêndice A.

Em relação aos elementos *major* seguidos (Ca e P) verifica-se uma ligeira diminuição nas suas concentrações após a execução do protocolo erosivo para todos os espécimes em estudo, à exceção do espécime T_1 , para o qual não se verificam alterações significativas.

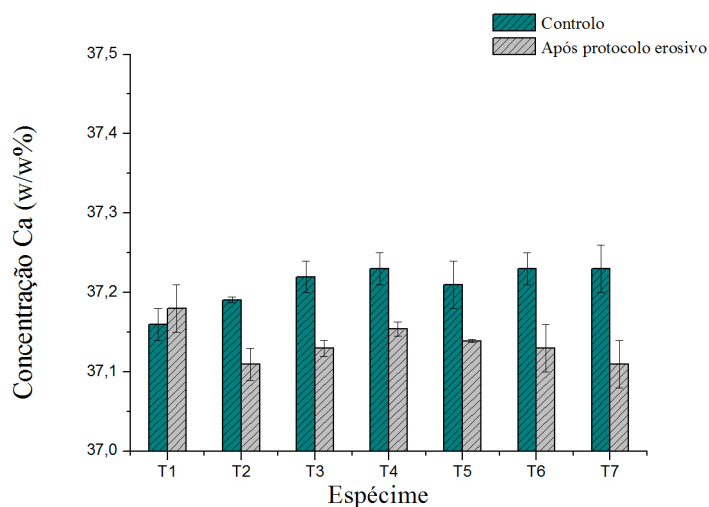


Figura 4.1: Gráfico de barras com comparação da concentração de Ca (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

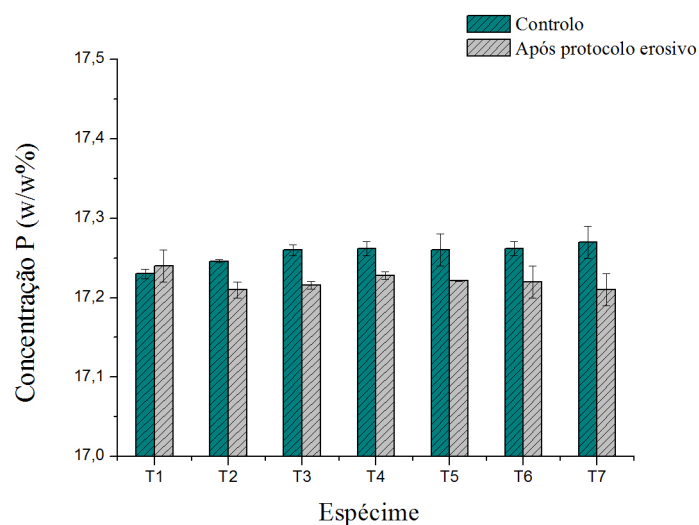


Figura 4.2: Gráfico de barras com comparação da concentração de P (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

Quanto aos elementos traço verifica-se, para todos os espécimes à exceção do T_1 , um aumento da concentração do Sr. Em relação ao S, apenas para os espécimes T_1 e T_5 a variação da concentração deste elemento não é estatisticamente significativa, sendo que para os restantes espécimes se verifica um aumento. Para os espécimes T_1 e T_4 pode observar-se uma diminuição do conteúdo em Fe e ainda uma diminuição do Zn para o T_3 .

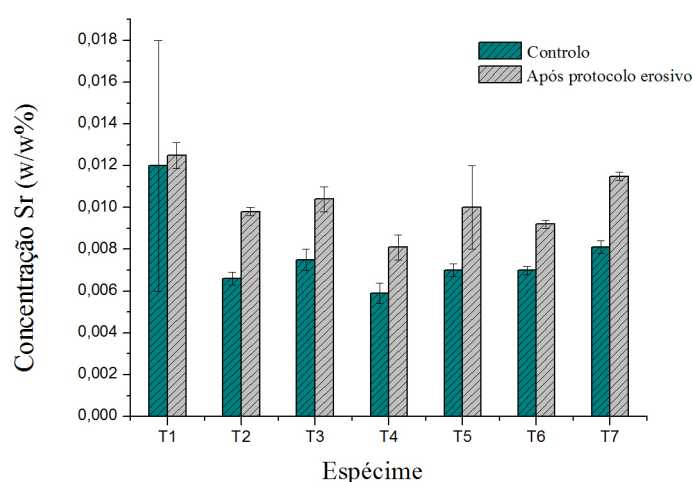


Figura 4.3: Gráfico de barras com comparação da concentração de Sr (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

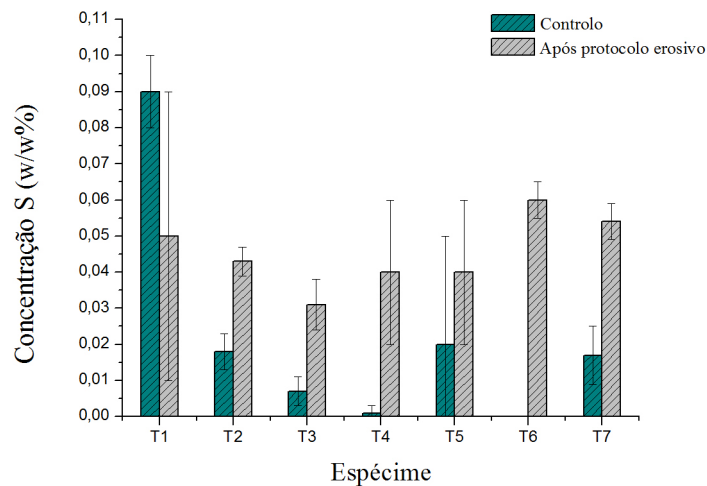


Figura 4.4: Gráfico de barras com comparação da concentração de S (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

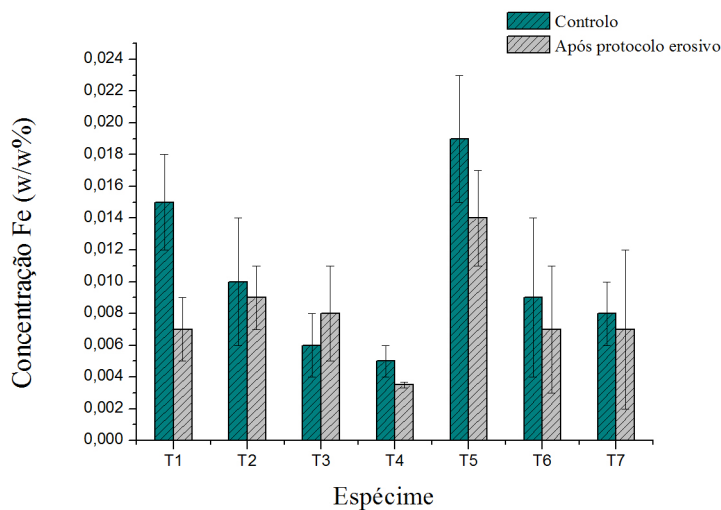


Figura 4.5: Gráfico de barras com comparação da concentração de Fe (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

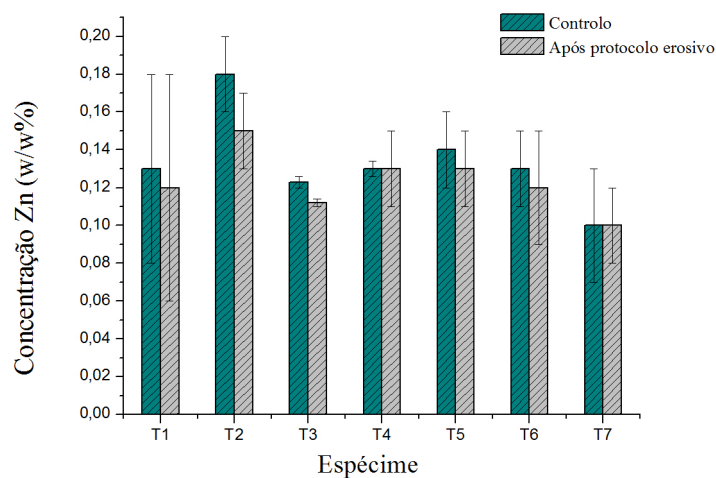


Figura 4.6: Gráfico de barras com comparação da concentração de Zn (w/w%) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

4.1.2 Avaliação da alteração do número atômico efetivo (Z_{ef}) por comparação dos picos de Rayleigh e Compton no espectro de EDXRF com geometria triaxial

A razão de intensidades dos picos dispersão de Rayleigh e Compton (R/C) é um parâmetro que permite caracterizar elementos apenas através do seu número atômico (Z). Como no caso da presente dissertação, se a amostra em estudo é um composto, a medida é associada ao seu número atômico efetivo (Z_{ef}). Deste modo, tentou-se perceber os efeitos do refrigerante na matriz de esmalte dentário através da variação desta razão.

O gráfico da Figura 4.7 apresenta a comparação entre os valores controlo e após execução do protocolo erosivo para cada espécime em estudo.

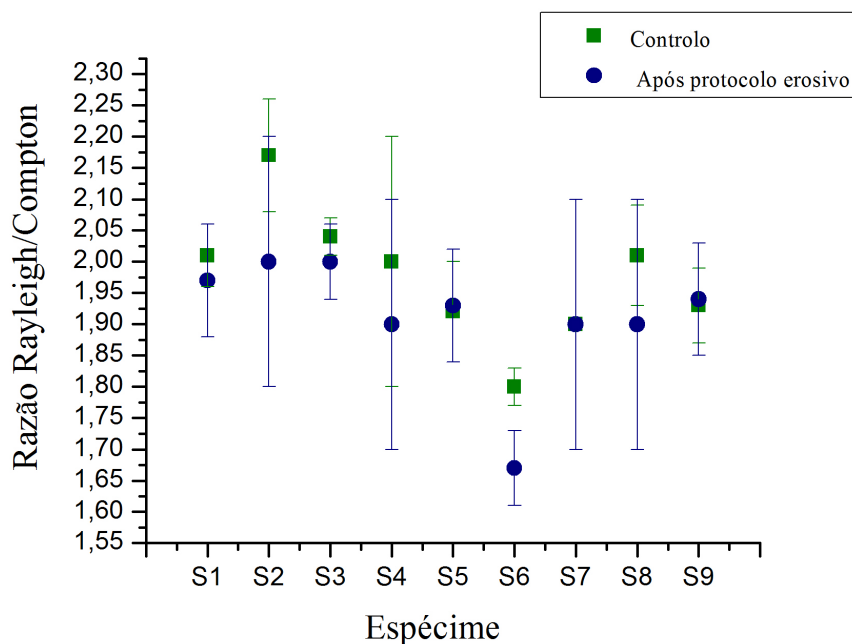


Figura 4.7: Gráfico com comparação da razão Rayleigh/Compton antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

Da análise do gráfico da Figura 4.7 pode observar-se um decréscimo da RD apenas para o espécime S_6 . Para os restantes espécimes, apesar de haver a sugestão de uma diminuição da razão R/C, as barras de erro intersectam-se resultando numa alteração não significativa.

4.1.3 Avaliar alterações da razão de despolarização no esmalte como medida de alteração da estrutura cristalina da HA - análise por μ -Raman Confocal

Com esta metodologia comparou-se os valores de razão de despolarização (RD) obtidos nas medições controlo com os valores obtidos nas medições após execução do protocolo erosivo.

O arranjo da estrutura cristalina da HA de esmalte é altamente sensível à variação da polarização entre o laser incidente e a radiação dispersa pela amostra, especialmente quando está mineralizado. À medida que ocorre desmineralização dentária, alterações na estrutura cristalina reduzem a sensibilidade da HA às variações de polarização e a razão de despolarização aumenta. Para os modos moleculares completamente simétricos, como é o caso do pico do grupo fosfato seguido neste estudo, quase nenhuma radiação perpendicularmente polarizada é emitida, o que significa que, teoricamente, a intensidade $I_{(960)\perp}$

é aproximadamente zero. No entanto, com a deterioração da estrutura cristalina dos cristais de HA por ação de ácidos, ocorre quebra de algumas ligações moleculares, passando a ser emitida alguma radiação perpendicularmente polarizada como consequência da diminuição da sensibilidade dos cristais à polarização perpendicular [62].

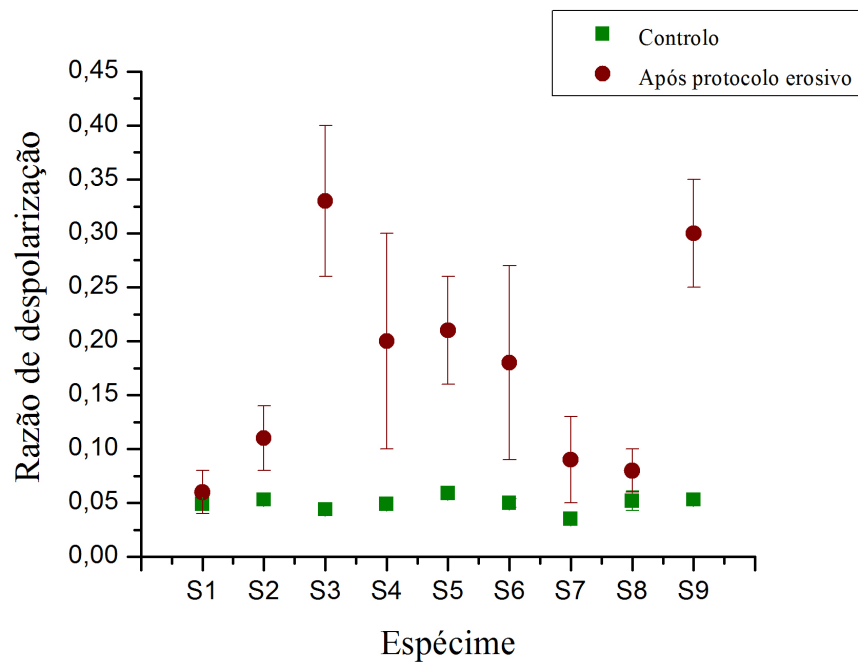


Figura 4.8: Gráfico com comparação da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas para cada espécime \pm desvios-padrão.

Da leitura do gráfico da Figura 4.8 pode observar-se um aumento da RD em todos os espécimes, à exceção do S_1 que não sofreu nenhuma alteração em relação ao seu valor inicial (controlo). No entanto, este aumento ocorreu com diferentes intensidades para os restantes espécimes em estudo, tendo sido mais acentuado nos espécimes S_3 , S_4 , S_5 , S_6 e S_9 .

4.2 Estudo da profundidade de desmineralização

4.2.1 Análise por μ -EDXRF

Neste estudo, de modo a calcular a profundidade de desmineralização, determinou-se a posição média do máximo de mineralização do Ca e do P para cada espécime (ver subsecção 3.3.1.2) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Seguidamente, calculou-se o deslocamento ocorrido para cada elemento em cada espécime.

A título de exemplo, os gráficos da Figura 4.9 mostram os deslocamentos para a direita do máximo de mineralização do Ca e do P para uma *line scan* do espécime T_6 . Estes gráficos são representativos do que aconteceu para as restantes *line scan* e restantes espécimes do grupo experimental. Os respetivos gráficos para cada espécime encontram-se no Apêndice B.

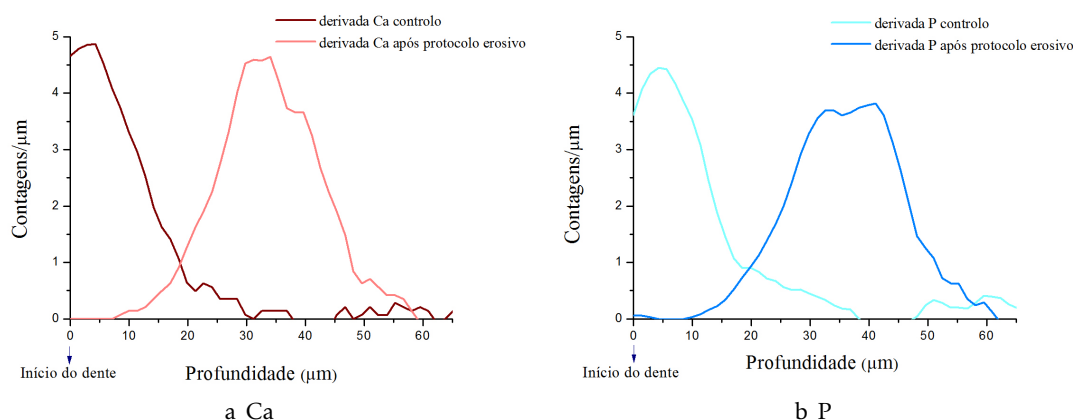


Figura 4.9: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca e do P em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_6 .

Após todo o processo de tratamento de resultados verifica-se para todas as *line scan* um deslocamento horizontal para a direita das curvas correspondentes aos elementos Ca e P. Os deslocamentos calculados para cada espécime encontram-se sumarizados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Tabela com deslocamentos (μm) da posição do máximo de mineralização do Ca e do P após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à diferença do valor médio das medições efetuadas e as incertezas foram obtidas através da Lei da Propagação de Incertezas para a subtração considerando as incertezas das distribuições da posição final e inicial (desvios-padrão)

Espécime	Deslocamento do Ca ($\mu\text{m} \pm \text{incerteza}$)	Deslocamento do P ($\mu\text{m} \pm \text{incerteza}$)
T_1	14 ± 7	16 ± 6
T_2	19 ± 2	22 ± 5
T_3	17 ± 6	17 ± 5
T_4	11 ± 4	14 ± 3
T_5	4 ± 2	7 ± 2
T_6	30 ± 4	33 ± 5
T_7	12 ± 7	10 ± 4

Analisando os resultados obtidos, verificam-se profundidades de desmineralização distintas para os vários espécimes. O intervalo de deslocamentos obtido foi de $[4, 30] \mu\text{m}$ para o Ca e de $[7, 33] \mu\text{m}$ para o P, sendo que para a maioria dos espécimes em estudo, com exceção do T_5 , foram obtidos deslocamentos de dezenas de μm para os dois elementos seguidos, o que é sugestivo de uma profundidade de desmineralização desta ordem de grandeza.

4.2.2 Análise por μ -Raman Confocal

Também neste grupo experimental se recorreu ao cálculo da razão de despolarização como método de avaliação da desmineralização.

Os gráficos da Figura 4.10 mostram a evolução da razão de despolarização ao longo de linhas analisadas em perfil nos grupos A e C - espécimes controlo (A_1 e C_1) a vermelho e respetivos espécimes experimentais (A_2 e C_2) a azul. Nas medições controlo verificou-se que a razão de despolarização se manteve aproximadamente constante e, por este motivo, optou-se por apresentar a média das 3 linhas medidas assim como o seu valor médio máximo e mínimo, representados pelas barras a tracejado. Estes gráficos são representativos do que aconteceu para os restantes grupos de espécimes (ver Apêndice C).

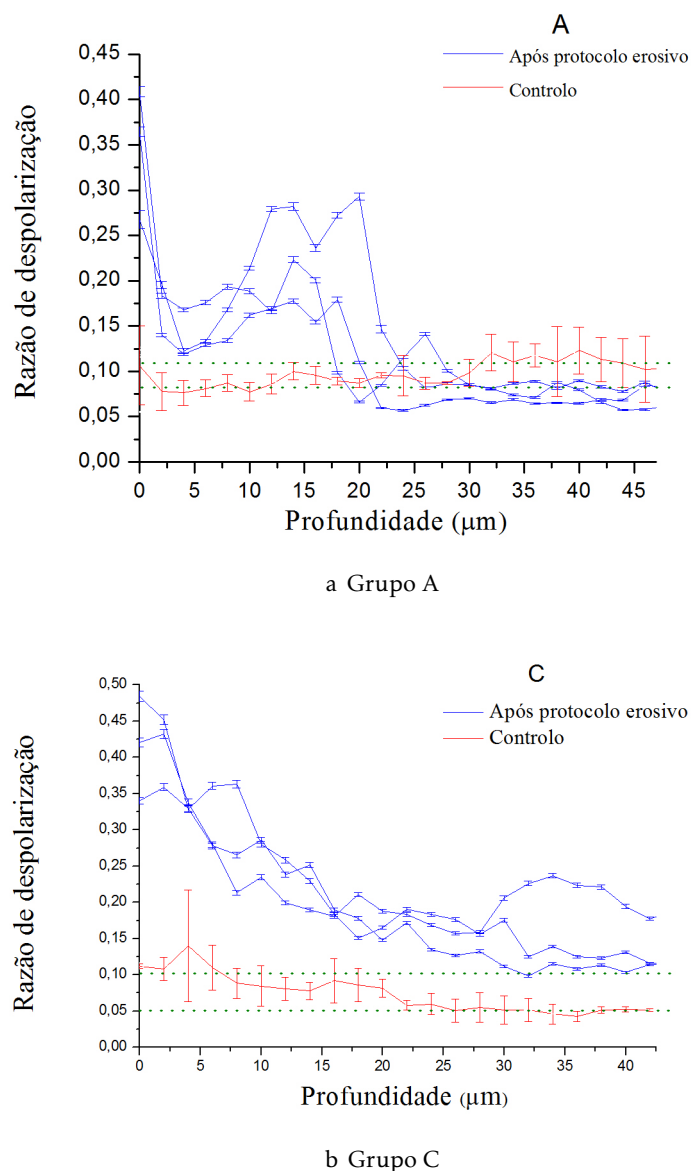


Figura 4.10: Gráficos com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para os grupos experimentais A e C. Para os grupos controlo os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste e a incerteza da distribuição (desvio-padrão). Para os grupos experimentais os resultados apresentados correspondem às 3 medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste.

Como podemos observar ambos os gráficos da Figura 4.10 seguem um comportamento semelhante: elevada RD no esmalte mais superficial, indicativo de desmineralização superficial, e à medida que avançamos para zonas mais internas de esmalte o valor de RD apresenta várias oscilações até estabilizar com um valor próximo ao do controlo, como verificado para o grupo A. No entanto para o grupo C os valores de RD do grupo experimental, embora apresentem uma diminuição, não atingiram os valores de controlo. Neste caso em particular não foi possível determinar um intervalo concreto de profundidade de desmineralização.

Os intervalos de profundidade de desmineralização foram obtidos através da interseção das curvas de razão de despolarização dos grupos experimentais com a barra do valor médio máximo obtido para os grupos controlo.

Na tabela 4.2 encontram-se apresentados os intervalos da profundidade de desmineralização obtidos para os espécimes deste estudo.

Tabela 4.2: Tabela com intervalos de profundidade de desmineralização (μm) após execução do protocolo de ciclos erosivos.

Espécime	Intervalo de profundidade de desmineralização (μm)
A_2	[18,28]
B_2	[3,38]
C_2	> 32
D_2	[4,12]
E_2	[3,20]

5 | Discussão de resultados

Neste capítulo é apresentada uma discussão conjugada de todos os resultados apresentados no capítulo anterior.

Na presente dissertação o estudo em superfície foi realizado com intuito de aferir a ocorrência de desmineralização causada por ação do refrigerante. Efetivamente, a maior parte dos resultados apresentados no capítulo anterior demonstram que ocorreu desmineralização superficial, evidenciada pela diminuição do teor em Ca e P e aumento aparente da concentração dos elementos traço Sr e S observada nas análises por μ -EDXRF, assim como pelo aumento da razão de despolarização observado nas análises por μ -Raman. Por outro lado, a variação da razão Rayleigh/Compton revelou-se não significativa devido, muito provavelmente, ao grande volume de espécime analisado. A área do feixe de análise utilizado, de $\sim 1.5 \text{ cm} \times 2.0 \text{ cm}$, assim como a elevada penetração da radiação numa matriz de HA tornam esta metodologia pouco sensível a tão pequenas alterações na matriz de HA (que se esperariam ser da ordem de grandeza de alguns μm), não sendo estas detetadas com a precisão deste método. De acordo com os estudos de Duvauchelle *et al* [63] uma diminuição do Z_{ef} é acompanhada por uma diminuição da razão R/C, independentemente do modelo matemático utilizado. Sendo a erosão dentária caracterizada principalmente pela dissolução de Ca e P, dois dos elementos *major* da matriz de HA de esmalte, esperar-se-ia que esta perda mineral resultasse numa diminuição do Z_{ef} dos espécimes, com consequente aumento da intensidade do pico de dispersão de Compton no espectro de EDXRF (processo de dispersão mais provável para materiais de baixo Z_{ef}). Assim, esperar-se-ia também uma diminuição da razão R/C comparativamente aos resultados obtidos nas medições controlo, que se verificou não significativa para a maioria dos espécimes em estudo. No entanto, é possível observar uma tendência de decréscimo desta razão.

O esmalte dentário é constituído essencialmente por cristais de HA - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com elementos traço incorporados. Estes últimos são incorporados na estrutura mineral do dente durante o seu processo de formação e, maioritariamente, devido a processos cumulativos derivados de contribuições externas ao longo da vida do indivíduo, como, por exemplo, local de residência ou trabalho (poluição ambiental), género, tipo de dente, hábito de fumar ou dieta [64]. Neste estudo os valores controlo de percentagem mássica (w/w%) obtidos para os elementos *major* Ca e P ($\sim 37\%$ e $\sim 17\%$, respetivamente) corroboram os valores de concentração média apresentados na literatura científica ($\sim 37\%$ para o Ca e $\sim 18\%$ para o P) [65]. Um aspeto relevante do *software* de quantificação utilizado é o facto de quantificar o P através do pico de Ca, pelo que qualquer alteração significativa a nível da concentração do Ca é também verificada em relação ao P.

O processo de erosão dentária é caracterizado principalmente pela dissolução do Ca^{2+} e do PO_4^{3-} , o que é consistente com a diminuição da concentração de Ca e P verificada nas análises por μ -EDXRF em superfície. Por outro lado, para além das alterações elementares da superfície dentária, existem estudos que reportam a existência de alterações morfológicas (diminuição da densidade e microdureza), que também são indicativas do enfraquecimento dos tecidos dentários causado pela ação de substâncias ácidas [28,

32, 66]. O aumento aparente da concentração verificado para os elementos traço Sr e S surge, muito possivelmente, como consequência destas alterações morfológicas que têm como consequência uma menor atenuação dos fótons destes elementos na matriz de HA sendo detetados aparentemente em maior concentração. Para além disso, os espécimes utilizados provêm de dentes prémolares e molares, o que pode explicar a muito baixa concentração dos elementos traço medida, já que a concentração destes elementos tende a diminuir dos dentes incisivos para os molares e da arcada maxilar para a mandibular [64, 67].

O aumento da razão de despolarização é um resultado consequente da deterioração da estrutura cristalina da HA devido ao processo de desmineralização por ação de substâncias ácidas [61]. Assim, também os resultados obtidos das medições diretas sobre a camada superficial de esmalte por μ -Raman são indicativos de desmineralização superficial e, para além disso, é ainda possível perceber que esta ocorreu com diferentes intensidades para os diferentes espécimes, o que não é perceptível através das outras metodologias de análise em superfície utilizadas.

Adicionalmente às medições em superfície, as medições em perfil foram realizadas com o intuito de quantificar a profundidade de desmineralização ocorrida. Os deslocamentos das posições dos máximos de mineralização de Ca e P, obtidos por μ -EDXRF, confirmam a diminuição da concentração destes elementos verificada na análise em superfície. Por outro lado, através das medições em perfil por μ -Raman é possível perceber com maior detalhe a evolução da desmineralização ao longo das linhas adquiridas em perfil. O comportamento díspar verificado entre as linhas experimentais de um mesmo espécime é sugestivo de que o processo de desmineralização não ocorre de igual maneira em toda a camada de esmalte. Durante as medições em perfil, tanto por μ -EDXRF como por μ -Raman, não houve uniformidade quanto à zona de esmalte analisada, sendo que para alguns espécimes foram analisadas zonas de esmalte mais espesso nas cúspides (esmalte mais resistente) e para outros zonas de esmalte mais fino próximas da raiz (esmalte mais frágil) [11]. Estas variações deveram-se à dificuldade em focar todos os espécimes na mesma zona, sendo este um critério importante para obter um bom sinal de aquisição, e que, de certo, contribuiu para as variações dos resultados obtidos. Comparando os dois estudos de desmineralização em profundidade realizados, os intervalos de profundidade de desmineralização obtidos são da mesma ordem de grandeza (dezenas de μm), o que demonstra consistência entre os resultados obtidos.

Por fim, e tendo em consideração que todos os espécimes foram submetidos ao mesmo protocolo experimental de ciclos erosivos e que a matriz em estudo é a mesma independentemente da metodologia de análise utilizada, é importante ter em consideração algumas características transversais a todos os estudos realizados. Em primeiro lugar, as várias oscilações verificadas nos valores de RD ao longo das linhas adquiridas em perfil

por μ -Raman são sugestivas da não uniformidade do processo de difusão dos ácidos através da camada de esmalte dentário, sendo que algumas zonas de esmalte podem ser mais afetadas pelo refrigerante do que outras. Por outro lado, é necessário ter em consideração a variabilidade biológica intrínseca de cada dente, assim como o facto de não se ter qualquer tipo de informação sobre a idade e género dos indivíduos a quem foram extraídos. O esmalte é um "material natural" e a sua composição e propriedades variam ligeiramente de dente para dente e de indivíduo para indivíduo (variabilidade biológica). Um exemplo é a variação na concentração de flúor nos vários espécimes. Como mecanismo de defesa à ação de substâncias ácidas, se existir flúor na saliva, pode ocorrer formação de FAP, uma superfície mineral muito menos solúvel em ambientes ácidos que a HA, tornando-o mais resistente a processos erosivos [8]. Uma vez que em nenhuma das metodologias de análise foi medido/quantificado este elemento, não se obteve informação sobre a sua concentração em cada espécime. Todos estes aspetos influenciam os resultados obtidos e ajudam a explicar o comportamento distinto de cada espécime face à ação do refrigerante.

6 | Conclusões e Perspetivas futuras

Neste capítulo são apresentadas as conclusões mais relevantes do trabalho e uma breve abordagem a perspetivas futuras em estudos na área.

6.1 Conclusões

Tendo em consideração as condições em que foi desenvolvido este estudo e a ação direta do refrigerante em esmalte dentário, podem tirar-se as seguintes conclusões:

- O pH do refrigerante utilizado medido em laboratório é bastante ácido ($\text{pH}=2,43$);

Medições em superfície:

- Observou-se a existência dos elementos químicos *major* Ca e P e dos elementos traço S, Fe, Zn, e Sr em todos os espécimes;
- Verificou-se uma ligeira diminuição das concentrações de Ca e P nas medições diretas sobre o esmalte;
- Para os elementos S e Sr verificou-se um aumento aparente da sua concentração, o que sugere uma desmineralização bastante superficial, afetando essencialmente a deteção de elementos traço, mais suscetíveis a fenómenos de atenuação na matriz de HA;
- Observou-se também um aumento da razão de despolarização nas medições por μ -Raman;
- Constatou-se que a técnica de EDXRF com geometria triaxial não tem sensibilidade suficiente para detetar tão pequenas alterações a nível da camada superficial de esmalte, sendo os resultados obtidos por esta análise não significativos;
- Resumidamente, os resultados obtidos em superfície são indicativos de alterações na matriz de esmalte por ação do refrigerante, sendo estes mais evidenciados aquando da análise por μ -Raman confocal, técnica mais sensível a alterações micrométricas na superfície de esmalte, e mais dificilmente mensuráveis no que respeita à análise por EDXRF;

Medições em profundidade:

- Para além das modificações a nível da superfície de esmalte, foram também observadas alterações em profundidade entre $[4, 30] \mu\text{m}$ para o Ca e $[7, 33] \mu\text{m}$ para o P, através da técnica de μ -EDXRF;
- Os intervalos de profundidade de desmineralização obtidos através da técnica de μ -Raman confocal estão compreendidos entre $[3, 38] \mu\text{m}$ e são da mesma ordem de grandeza dos deslocamentos obtidos para o Ca e P pela técnica de μ -EDXRF;

Como conclusão mais geral desta dissertação e, tendo em conta a curta duração do protocolo erosivo executado, conclui-se que o consumo de 3 Coca-Colas® por dia, durante apenas 10 dias, provoca efetivamente desmineralização dentária, tanto em superfície, como em profundidade. Os resultados obtidos demonstram que os refrigerantes apresentam um elevado potencial erosivo para os tecidos dentários, sendo bastante prejudiciais à saúde oral.

6.2 Perspetivas futuras

O presente estudo é do tipo *in vitro* e tem em conta apenas a ação direta do refrigerante em esmalte dentário. Futuramente, seria importante desenvolver um modelo com maior proximidade às condições intraorais reais, utilizando saliva humana (em vez de artificial), assim como realizar estudos de variação do pH salivar resultante da ingestão de refrigerantes para posterior aplicação durante a execução do protocolo de ciclos erosivos.

As alterações elementares superficiais verificadas a nível do esmalte aprismático podem não ser totalmente irreversíveis. Assim, uma abordagem futura igualmente importante seria tentar quantificar o processo de reversibilidade da desmineralização ocorrida, expondo os espécimes previamente desmineralizados à ação da saliva, ou até de agentes remineralizantes utilizados em consultório. Os mecanismos compensatórios da saliva na cavidade oral são indispensáveis para a manutenção da saúde oral, uma vez que a sua supersaturação iónica conduz à incorporação de iões na HA de esmalte, induzindo a sua remineralização.

Outro aspeto importante seria ter um conhecimento prévio sobre cada dente, como idade e género dos indivíduos a quem foram extraídos, de modo a categorizar os diferentes grupos experimentais e estudar com maior detalhe a contribuição destas variantes no desenvolvimento da erosão dentária.

Por último, seria ideal conseguir-se uma monitorização *in vivo* da desmineralização dentária, o que só seria possível com tecnologia mais avançada, resultante de estudos mais aprofundados sobre o tema.

No que diz respeito às metodologias utilizadas para análise dos espécimes em perfil, mais concretamente à análise em perfil por μ -Raman confocal, seria necessário desenvolver uma metodologia e um material eficaz na fixação da amostra para análise e que, de preferência, seja de montagem reversível, de modo a permitir o estudo *self-control* e uma boa focalização da amostra durante a aquisição dos espetros.

Referências Bibliográficas

- [1] K. D. Jandt. “Probing the future in functional soft drinks on the nanometre scale-towards tooth friendly soft drinks”. Em: *Trends in Food Science and Technology* 17.5 (2006), pp. 263–271. ISSN: 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.11.016.
- [2] L. R. Vartanian, M. B. Schwartz e K. D. Brownell. “Effects of soft drink consumption on nutrition and health: A systematic review and meta-analysis”. Em: *American Journal of Public Health* 97.4 (2007), pp. 667–675. ISSN: 00900036. DOI: 10.2105/AJPH.2005.083782.
- [3] Direção-Geral de Saúde. *Alimentação Saudável em Números - 2015*. Rel. téc. 2016, p. 38.
- [4] M. Madeira. *Anatomia do Dente*. 5ª. São Paulo: Sarvier, 2007, p. 3. ISBN: 9788573781762. URL: <https://www.passeidireto.com/arquivo/1497803/livro---anatomia-do-dente---madeira-5ed>.
- [5] J. A. Esperança Pina. *Anatomia Humana dos Órgãos*. 2ª. Lisboa: LIDEL - Edições Técnicas, Lda., 2010, pp. 70–74. ISBN: 978-972-757-662-3.
- [6] C. Van Putte, J. Regan e A. Russo. *Seeley's Essentials of Anatomy and Physiology*. 9ª. Nova Iorque: McGraw-Hill Education, 2016, p. 445. ISBN: 978-0-07-809732-4.
- [7] A. R. T. Cate. *Oral Histology*. 4ª. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1994, pp. 239–245. ISBN: 0-8016-7966-4.
- [8] J. D. B. Featherstone e A. Lussi. “Understanding the Chemistry of Dental Erosion”. Em: *Monogr Oral Sci. Basel* 20 (2006), pp. 66–76. DOI: 10.1159/000093351.
- [9] a. V. N. Amerongen e E. C. I. Veerman. “Saliva—the defender of the oral cavity.” Em: *Oral diseases* 8.1 (2002), pp. 12–22. ISSN: 1354-523X. DOI: 10.1034/j.1601-0825.2002.10816.x.
- [10] J. Godinho. “Espetroscopia de Raios X na Detecção de Alterações Elementares no Esmalte Dentário Após Branqueamento”. Tese de Mestrado. Universidade de Lisboa, 2013, p. 21.
- [11] B. Berkovitz, B. Moxham, R. Linden e A. Sloan. *Master Dentistry - Oral Biology*. 3ª. Londres: Churchill Livingstone, Elsevier Ltd., 2011, pp. 79–80;142–143. ISBN: 978-0-702-03122-9.

- [12] B. K. B. Berkovitz, G. R. Holland e B. J. Moxham. *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal*. 3ª. Porto Alegre RS: ARTMED, 2004, pp. 101–118. ISBN: 0-7234-3181-7.
- [13] C. D. Lynch, V. R. O’Sullivan, P. Dockery, C. T. McGillicuddy e A. J. Sloan. “Hunter-Schreger Band patterns in human tooth enamel”. Em: *Journal of Anatomy* 217.2 (2010), pp. 106–115. ISSN: 00218782. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2010.01255.x.
- [14] C. M. Barbosa. “Desgaste Dentário e Prótese Removível”. Tese de Mestrado. Universidade do Porto, 2005, pp. 23–24;
- [15] A. Lussi. *Dental Erosion From Diagnosis to Therapy*. Switzerland: KARGER, 2006, pp. 6; 9–10; ISBN: 3-8055-8097-5.
- [16] Associação Portuguesa de Higienistas Orais. *Desgaste Dentário*. URL: <http://www.apho.pt/node/28> (acedido em 13/01/2017).
- [17] D. F. B. Manguiera, I. A. Passos, A. F. B. de Oliveira e F. C. Sampaio. “Erosão dentária: etiologia, diagnóstico, prevalência e medidas preventivas”. Em: *Arquivos em Odontologia* 45.4 (2016). ISSN: 2178-1990.
- [18] S. P. Humphrey e R. T. Williamson. “A review of saliva: Normal composition, flow, and function”. Em: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85.2 (2001), pp. 162–169. ISSN: 00223913. DOI: 10.1067/mp.2001.113778. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022391301540329>.
- [19] A. Lussi e T. Jaeggi. “Erosion - Diagnosis and risk factors”. Em: *Clinical Oral Investigations* 12.SUPPL.1 (2008), pp. 5–13. ISSN: 14326981. DOI: 10.1007/s00784-007-0179-z.
- [20] D. T. Zero. “Etiology of dental erosion–extrinsic factors.” Em: *European journal of oral sciences* 104.2 (Pt 2) (1996), pp. 162–77. ISSN: 0909-8836. DOI: 10.1111/j.1600-0722.1996.tb00065.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804884>.
- [21] D. E.&B. S. D.W. BARTLETT. “The relationship between gastro-oesophageal reflux disease and dental erosion - CALS_USM - California State University San Marcos”. Em: *Journal of Oral Rehabilitatio* (1996), pp. 289–297. URL: http://primo-pmtna01.hosted.exlibrisgroup.com/primo{_}library/libweb/action/display.do?frbrVersion=3{\&}tabs=detailsTab{\&}ct=display{\&}fn=search{\&}doc=TN{_}wj10.1111/j.1365-2842.1996.tb00855.x{\&}indx=1{\&}recIds=TN{_}wj10.1111/j.1365-2842.1996.tb00855.x{\&}recIdxs=0{\&}elementId=0.
- [22] A. Borjian, C. C. F. Ferrari, A. Anouf e L. Z. G. Touyz. “Pop-Cola Acids and Tooth Erosion: An <i>In Vitro</i> , <i>In Vivo</i> , Electron-Microscopic, and Clinical Report”. Em: *International Journal of Dentistry* 2010.1 (2010), pp. 1–12. ISSN: 1687-8728. DOI: 10.1155/2010/957842. URL: <http://www.hindawi.com/journals/ijd/2010/957842/>.

- [23] M. Kitchens e B. M. Owens. "Enamel erosion caused by beverages". Em: *Dental Abstracts* 54.1 (2009), pp. 37–39. ISSN: 00118486. DOI: 10.1016/j.denabs.2008.08.033. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011848608004202>.
- [24] C. Llena, L. Forner e P. Baca. "Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: A review of the literature". Em: *Journal of Contemporary Dental Practice* 10.3 (2009), pp. 1–9. ISSN: 15263711. DOI: 1526-3711-598[pii].
- [25] Y. F. Ren, A. Amin e H. Malmstrom. "Effects of tooth whitening and orange juice on surface properties of dental enamel". Em: *Journal of Dentistry* 37.6 (2009), pp. 424–431. ISSN: 03005712. DOI: 10.1016/j.jdent.2009.01.011.
- [26] M Kitchens e B. Owens. "Enamel erosion caused by beverages". Em: *Dental Abstracts* 54.1 (2009), pp. 37–39. ISSN: 00118486. DOI: 10.1016/j.denabs.2008.08.033. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011848608004202>.
- [27] Y.-L. Wang, C.-C. Chang, C.-W. Chi, H.-H. Chang, Y.-C. Chiang, Y.-C. Chuang, H.-H. Chang, G.-F. Huang, Y.-S. Liao e C.-P. Lin. "Erosive potential of soft drinks on human enamel: An in vitro study". Em: *Journal of the Formosan Medical Association* 113 (2014), pp. 850–856. DOI: 10.1016/j.jfma.2014.06.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2014.06.002>www.j.
- [28] S. Braga, D. Faria, E. Oliveira e M. Sobral. "Morphological and mineral analysis of dental enamel after erosive challenge in gastric juice and orange juice". Em: *Microscopy Research and Technique* 74.12 (2011), pp. 1083–1087. ISSN: 1059910X. DOI: 10.1002/jemt.20998.
- [29] G. Pezzotti, T. Adachi, I. Gasparutti, G. Vincini, W. Zhu, M. Boffelli, A. Rondinella, E. Marin, H. Ichioka, T. Yamamoto, Y. Marunaka e N. Kanamura. "Vibrational monitor of early demineralization in tooth enamel after in vitro exposure to phosphoric liquid". Em: *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 173 (2017), pp. 19–33. ISSN: 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2016.08.036. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2016.08.036>.
- [30] J. Zheng, F. Xiao, L. Qian e Z. Zhou. "Erosion behavior of human tooth enamel in citric acid solution". Em: *Tribology International* 42.11-12 (2009), pp. 1558–1564. ISSN: 0301679X. DOI: 10.1016/j.triboint.2008.12.008. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X08002685>.
- [31] J. Castro, J. Godinho, A. Mata, J. M. Silveira e S. Pessanha. "Study of the effects of unsupervised over-the counter whitening products on dental enamel using micro-Raman and micro-EDXRF spectroscopies". Em: *Journal of Raman Spectroscopy* 47.4 (2016), pp. 444–448. ISSN: 10974555. DOI: 10.1002/jrs.4840.
- [32] R. M. P. Leme, R. A. de Faria, J. B. Gomes, J. D. B. de Mello e L. d. S. Castro-Filice. "Comparação in vitro do efeito de bebidas ácidas no desenvolvimento da erosão dental: Análise por microscopia eletrônica de varredura". Em: *Bioscience Journal* 27.1 (2011), pp. 162–169. ISSN: 15163725.

- [33] L. A. Ehlen, T. A. Marshall, F. Qian, J. S. Wefel e J. J. Warren. “Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion”. Em: *Nutrition Research* 28.5 (2008), pp. 299–303. ISSN: 02715317. DOI: 10.1016/j.nutres.2008.03.001. arXiv: NIHMS150003.
- [34] D. Guimarães. “Measurement of lead concentration in biological tissues by atomic spectroscopy techniques”. Tese de Doutorado. Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- [35] M. Tipler, Paul A.; Gene. *Physics for Scientists and Engineers*. 6ª. Nova Iorque: W. H. Freeman e Company, 2008, pp. 1250–1255. ISBN: 0-7167-8964-7.
- [36] S. R. Cherry, J. A. Sorenson e M. E. Phelps. *Physics in Nuclear Medicine*. 4ª. Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc., 2012, pp. 74–78. ISBN: 978-1-4160-5198-5.
- [37] G. Gaultz e T. Vo-Dinh. *Handbook of Spectroscopy*. Weinheim: WILEY-VCH, 2003, pp. 39–44; 367–372; 393–401. ISBN: 3-527-29782-0.
- [38] E. B. Podgorsak. *Radiation Physics for Medical Physicists*. 2nd. Berlin: Springer, 2010. ISBN: 978-3-642-00874-0. DOI: 10.1007/978-3-642-008745-7.
- [39] S. Svanberg. *Atomic and Molecular Spectroscopy*. 3ª. Berlim: Springer, 2001, pp. 71–79. ISBN: 3-540-67432-2.
- [40] Bruker. *M4 TORNADO*. 2017. URL: <https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/technical-details/spot-size.html> (acedido em 05/02/2017).
- [41] M. Ferretti. “Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais”. Em: *CPC* 7 (2009), pp. 74–98.
- [42] M. L. Carvalho, J. Brito e M. A. Barreiros. “Study of Trace Element Concentrations in Human Tissues by EDXRF Spectrometry”. Em: *X-Ray Spectrometry* 27.3 (1998), pp. 198–204. ISSN: 1097-4539. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4539(199805/06)27:3<198::AID-XRS265>3.0.CO;2-B.
- [43] P. K. Nayak, T. R. Rautray e V Vijayan. “EDXRF: A non-destructive technique for multi-elemental analysis of coins”. Em: *Indian Journal of Pure & Applied Physics* 42 (2004), pp. 319–322.
- [44] K. G. Mejía-Piña, M. A. Huerta-Díaz e O. González-Yajimovich. “Calibration of handheld X-ray fluorescence (XRF) equipment for optimum determination of elemental concentrations in sediment samples”. Em: *Talanta* 161 (2016), pp. 359–367. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.08.066. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.066>.

- [45] D. N. Papadopoulou, G. A. Zachariadis, A. N. Anthemidis, N. C. Tsirliganis e J. A. Stratis. "Development and optimisation of a portable micro-XRF method for in situ multi-element analysis of ancient ceramics". Em: *Talanta* 68.5 (2006), pp. 1692–1699. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.08.051.
- [46] T. Magalhães, A. von Bohlen, M. L. Carvalho e M. Becker. "Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF". Em: *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 61.10-11 SPEC. ISS. (2006), pp. 1185–1193. ISSN: 05848547. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.002.
- [47] A. S. Moreno. "NON-DESTRUCTIVE CHARACTERIZATION OF ARTWORKS IN PAPER SUPPORT USING SPECTROSCOPIC TECHNIQUES". Tese de doutoramento. Universidade de Lisboa, 2013.
- [48] R. Tanaka, K. Yuge e H. Alawadhi. "Artificial peaks in energy dispersive X-ray spectra : sum peaks , escape peaks , and diffraction peaks". Em: December 2015 (2017), pp. 5–11. DOI: 10.1002/xrs.2697.
- [49] G. S. Bumrah e R. M. Sharma. "Raman spectroscopy ??? Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse". Em: *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 6.3 (2016), pp. 209–215. ISSN: 20905939. DOI: 10.1016/j.ejfs.2015.06.001. arXiv: 00387010.2010.525285 [10.1080]. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>.
- [50] H Tsuda e J Arends. "Advances in Dental Research". Em: *SAGE Journals* 11.4 (1997), pp. 539–547. DOI: 10.1177/08959374970110042301.
- [51] E. Smith e G. Dent. *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2005, pp. 2–7. ISBN: 0-471-49668-5.
- [52] N. B. Colthup, L. H. Daly e S. E. Wiberley. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3ª. San Diego, California: Academic Press, Inc., 1990, pp. 60–62. ISBN: 9780121825546.
- [53] J. Castro. "Estudo dos efeitos do abuso de produtos de branqueamento no esmalte dentário". Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [54] T. Dieing, O. Hollricher e J. Toporski. *Confocal Raman Microscopy*. Berlim: Springer, 2010, pp. 3; 43–47. ISBN: 979-3-642-12522-5.
- [55] K. Eberhardt, C. Stiebing, C. Matthäus, M. Schmitt e J. Popp. "Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update." Em: *Expert review of molecular diagnostics* 15.6 (2015), pp. 773–87. ISSN: 1744-8352. DOI: 10.1586/14737159.2015.1036744. URL: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/14737159.2015.1036744>.
- [56] S. J. Nelson e M. M. Ash. *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, and Occlusion*. 9th. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2010. ISBN: 978-1-4160-6209-7.

- [57] G. M.O. D. Queiroz, L. F. Silva, J. T. L. Ferreira, J. A.D.C. P. Gomes e L. Sathler. “Electrochemical behavior and pH stability of artificial salivas for corrosion tests”. Em: *Brazilian Oral Research* 21.3 (2007), pp. 209–215. ISSN: 18068324.
- [58] P. J. Custódio, M. L. Carvalho, F. Nunes, S. Pedroso e A. Campos. “Direct analysis of human blood (mothers and newborns) by energy dispersive X-ray fluorescence”. Em: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19.2-3 (2005), pp. 151–158. ISSN: 0946672X. DOI: 10.1016/j.jtemb.2005.09.002.
- [59] M. Guerra, C. Ferreira, M. Carvalho, J. Santos e S. Pessanha. “Distribution of toxic elements in teeth treated with amalgam using μ -energy dispersive X-ray fluorescence”. Em: *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 122 (2016), pp. 114–117. ISSN: 05848547. DOI: 10.1016/j.sab.2016.06.006.
- [60] H. Scientific. *Raman Spectroscopy*. 2017. URL: <http://www.horiba.com/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/what-is-polarised-raman-spectroscopy/> (acedido em 29/08/2017).
- [61] A. C.-T. Ko, L.-P. Choo-Smith, M. Hewko, M. G. Sowa, C. C. S. Dong e B. Cleghorn. “Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy.” Em: *Optics express* 14.1 (2006), pp. 203–215. ISSN: 1094-4087. DOI: 10.1364/OPEX.14.000203.
- [62] M. Reichenbacher e J. Popp. *Challenges in Molecular Structure Determination*. Springer, 2012, pp. 70–71. ISBN: 978-3-642-24389-9. DOI: 10.1007/978-3-642-24390-5. arXiv: arXiv:1011.1669v3. URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-24390-5>.
- [63] P. Duvauchelle, G. Peix e D. Babot. “Effective atomic number in the Rayleigh to Compton scattering ratio”. Em: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 155.3 (1999), pp. 221–228. ISSN: 0168583X. DOI: 10.1016/S0168-583X(99)00450-4.
- [64] A. Fischer, D. Wiechula, L. Postek-Stefańska e J. Kwapuliński. “Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth”. Em: *Biological Trace Element Research* 132.1-3 (2009), pp. 19–26. ISSN: 01634984. DOI: 10.1007/s12011-009-8383-0.
- [65] E. Reitznerová, D. Amarasiriwardena, M. Kopčáková e R. M. Barnes. “Determination of Some Trace Elements in Human Tooth Enamel”. Em: *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry* 367.8 (2000), pp. 748–754. ISSN: 0937-0633. DOI: 10.1007/s002160000461. URL: <http://apps.webofknowledge.com/full{ }record.do?product=UA{ }&search{ }mode=GeneralSearch{ }&qid=12{ }&SID=Z2NQNDTwoFtOG8y3h46{ }&page=1{ }&doc=6>.
- [66] L. Lupi-Pegurier, M. Muller, E. Leforestier, M. F. Bertrand e M. Bolla. “In vitro action of Bordeaux red wine on the microhardness of human dental enamel”. Em: *Archives of Oral Biology* 48.2 (2003), pp. 141–145. ISSN: 00039969. DOI: 10.1016/S0003-9969(02)00206-6.

- [67] A. Alomary, I. F. Al-Momani, S. M. Obeidat e A. M. Massadeh. “Levels of lead, cadmium, copper, iron, and zinc in deciduous teeth of children living in Irbid, Jordan by ICP-OES: Some factors affecting their concentrations”. Em: *Environmental Monitoring and Assessment* 185.4 (2013), pp. 3283–3295. ISSN: 01676369. DOI: 10.1007/s10661-012-2790-y.

A | Apêndice A

Tabelas com as concentrações elementares (w/w%) para cada espécime resultantes da análise em superfície por μ -EDXRF.

Tabela A.1: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_1 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,16 \pm 0,02	37,18 \pm 0,03
P	17,230 \pm 0,006	17,24 \pm 0,02
S	0,09 \pm 0,01	0,05 \pm 0,04
Fe	0,015 \pm 0,003	0,007 \pm 0,002
Zn	0,13 \pm 0,05	0,12 \pm 0,06
Sr	0,012 \pm 0,006	0,0125 \pm 0,0006

Tabela A.2: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_2 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,191 \pm 0,004	37,11 \pm 0,02
P	17,246 \pm 0,002	17,21 \pm 0,01
S	0,018 \pm 0,005	0,043 \pm 0,004
Fe	0,010 \pm 0,004	0,009 \pm 0,002
Zn	0,18 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02
Sr	0,0066 \pm 0,0003	0,0098 \pm 0,0002

Tabela A.3: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_3 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,22 \pm 0,02	37,13 \pm 0,01
P	17,26 \pm 0,007	17,216 \pm 0,005
S	0,007 \pm 0,004	0,031 \pm 0,007
Fe	0,006 \pm 0,002	0,008 \pm 0,003
Zn	0,123 \pm 0,003	0,112 \pm 0,002
Sr	0,0075 \pm 0,0005	0,0104 \pm 0,0006

Tabela A.4: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_4 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,22 \pm 0,02	37,154 \pm 0,009
P	17,262 \pm 0,009	17,228 \pm 0,005
S	0,001 \pm 0,002	0,04 \pm 0,02
Fe	0,005 \pm 0,001	0,0035 \pm 0,0002
Zn	0,130 \pm 0,004	0,13 \pm 0,02
Sr	0,0059 \pm 0,0005	0,0081 \pm 0,0006

Tabela A.5: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos para o espécime T_5 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,21 \pm 0,03	37,139 \pm 0,002
P	17,26 \pm 0,02	17,2214 \pm 0,0007
S	0,02 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02
Fe	0,019 \pm 0,004	0,014 \pm 0,003
Zn	0,14 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02
Sr	0,0070 \pm 0,0003	0,010 \pm 0,002

Tabela A.6: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de cilos erosivos para o espécime T_6 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,23 \pm 0,02	37,13 \pm 0,03
P	17,262 \pm 0,009	17,22 \pm 0,02
S	abaixo do limite de detecção	0,060 \pm 0,005
Fe	0,009 \pm 0,005	0,007 \pm 0,004
Zn	0,13 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03
Sr	0,0070 \pm 0,0002	0,0092 \pm 0,0002

Tabela A.7: Tabela com comparação das concentrações elementares (w/w%) antes e após execução do protocolo de cilos erosivos para o espécime T_7 . Os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas \pm desvios-padrão

Elemento	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (controle)	Concentração (w/w% \pm desvio padrão) (após protocolo erosivo)
Ca	37,23 \pm 0,03	37,11 \pm 0,03
P	17,27 \pm 0,02	17,21 \pm 0,02
S	0,017 \pm 0,008	0,054 \pm 0,005
Fe	0,008 \pm 0,002	0,007 \pm 0,005
Zn	0,10 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02
Sr	0,0081 \pm 0,0003	0,0115 \pm 0,0002

B | Apêndice B

Gráficos dos deslocamentos das curvas das derivadas de Ca e P para cada espécime resultantes da análise em profundidade por μ -EDXRF.

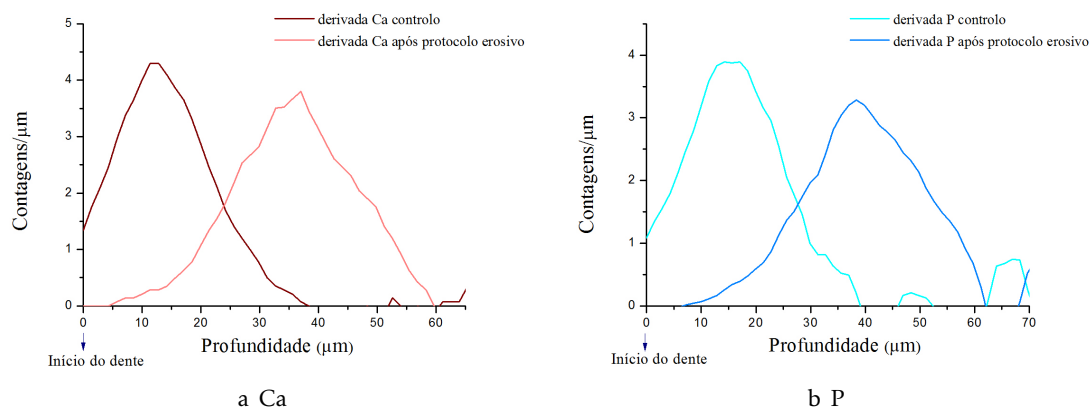


Figura B.1: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_1 .

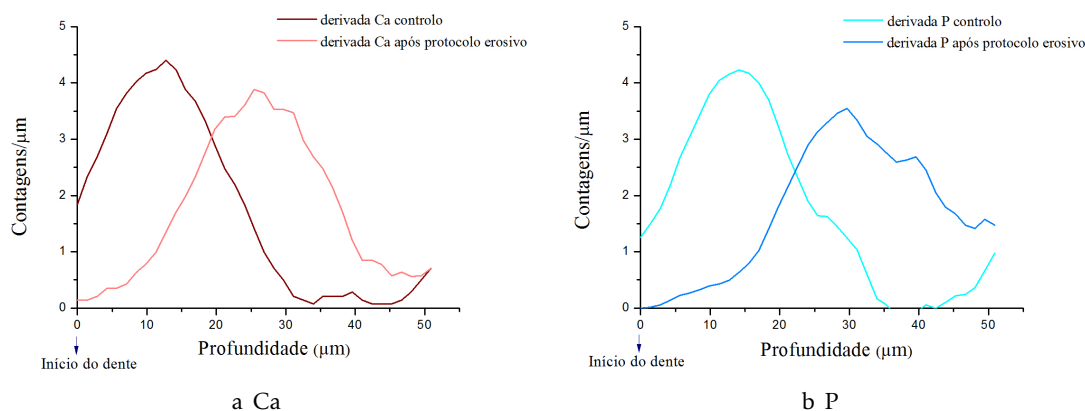


Figura B.2: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_2 .

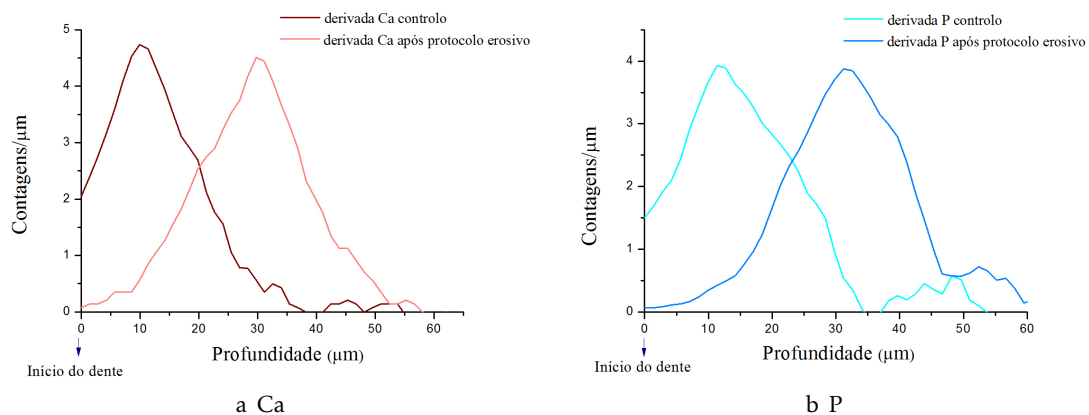


Figura B.3: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_3 .

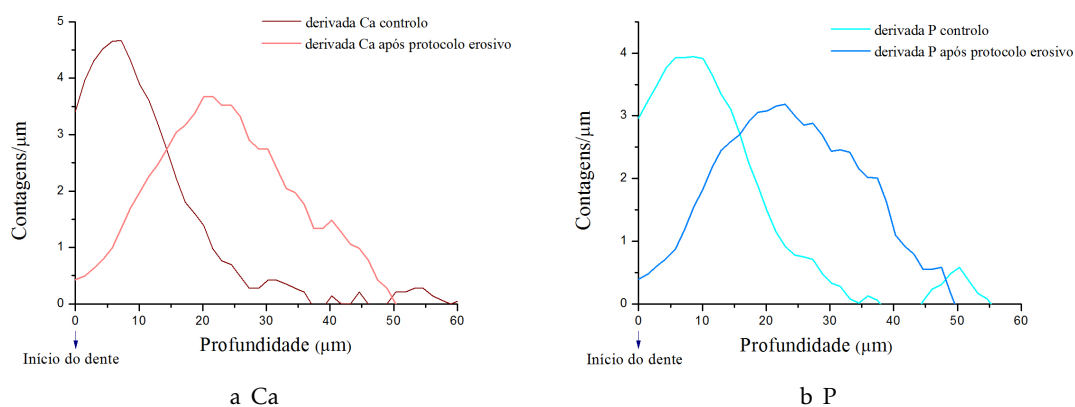


Figura B.4: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_4 .

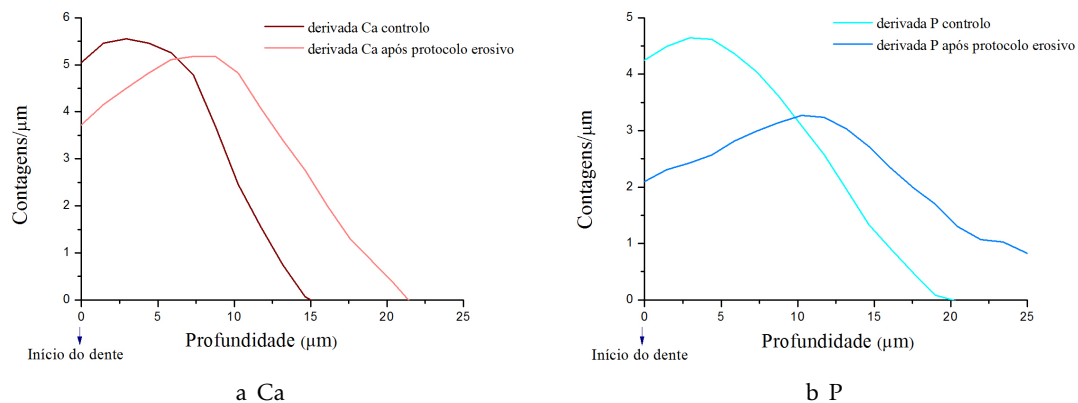


Figura B.5: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_5 .

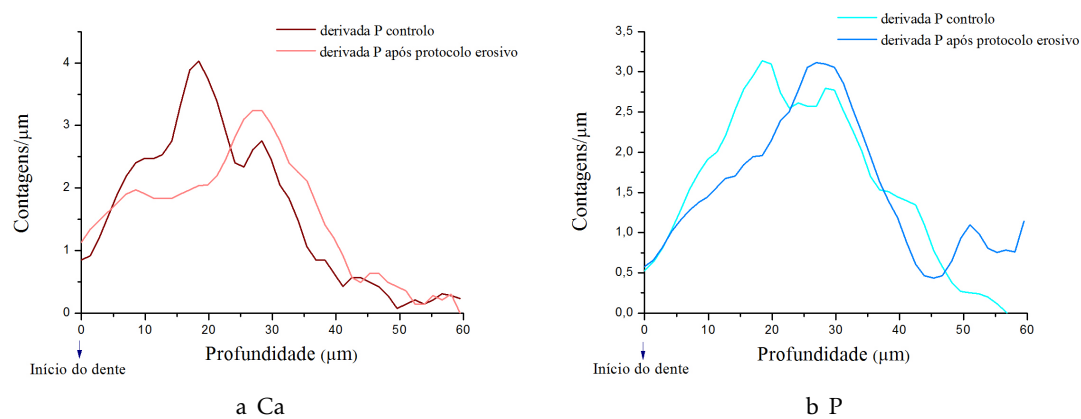


Figura B.6: Gráficos com a taxa de variação das contagens do Ca (a) e do P (b) em função da posição (μm) antes e após execução do protocolo de ciclos erosivos. Os resultados apresentados correspondem à derivação de uma *line scan* obtida para o espécime T_7 .

C | Apêndice C

Gráficos da evolução da razão de despolarização ao longo de linhas analisadas em perfil para cada grupo experimental resultantes da análise em profundidade por μ -Raman confocal.

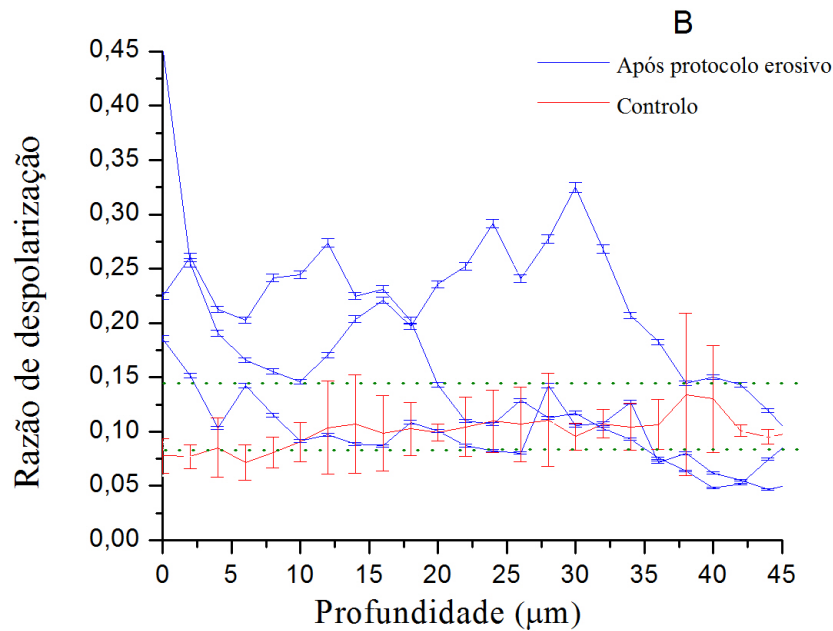


Figura C.1: Gráfico com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para o grupo experimental B. Para o grupo controlo os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste e a incerteza da distribuição (desvio-padrão). Para o grupo experimental os resultados apresentados correspondem às 3 medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste.

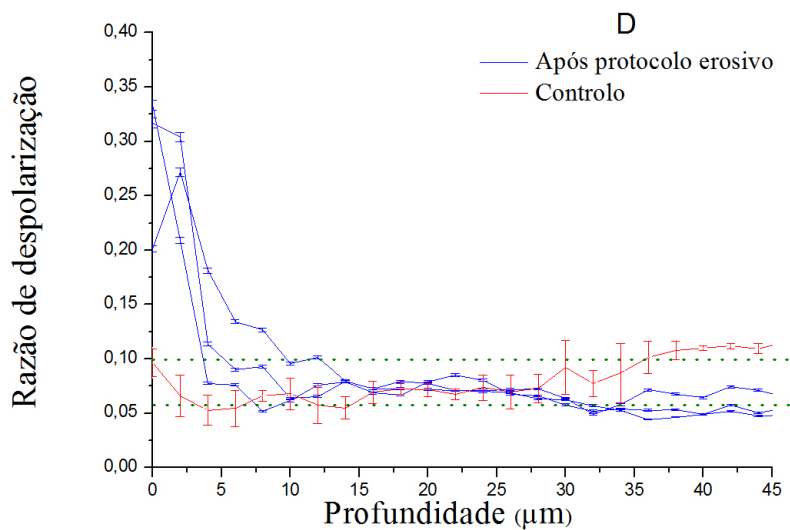


Figura C.2: Gráfico com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para o grupo experimental D. Para o grupo controlo os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste e a incerteza da distribuição (desvio-padrão). Para o grupo experimental os resultados apresentados correspondem às 3 medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste.

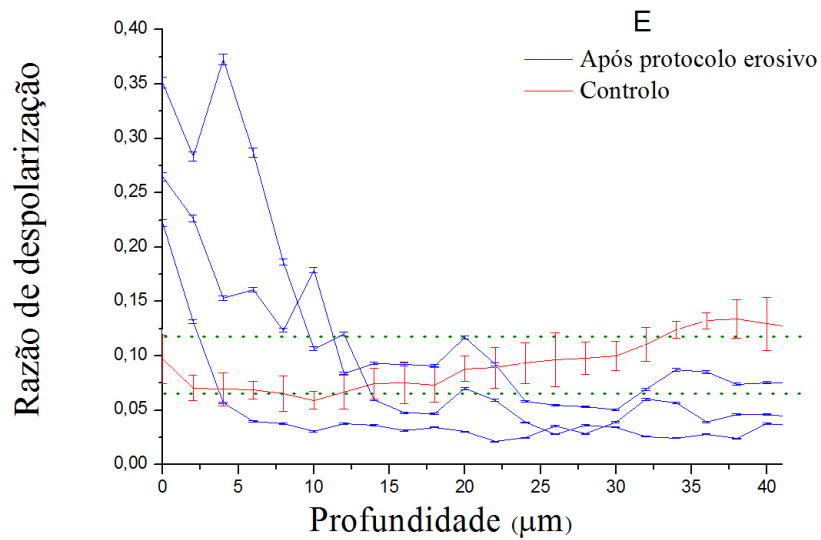


Figura C.3: Gráfico com comparação da evolução da razão de despolarização (RD) antes e após execução do protocolo experimental de ciclos erosivos para o grupo experimental E. Para o grupo controlo os resultados apresentados correspondem ao valor médio das medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste e a incerteza da distribuição (desvio-padrão). Para o grupo experimental os resultados apresentados correspondem às 3 medições efetuadas e as barras de erro foram obtidas através da Lei de Propagação de Incertezas para a divisão considerando uma incerteza de 1% no ajuste.

D | Apêndice D - Exposição do trabalho

Poster apresentado no *1st Nova Biomedical Engineering Workshop* realizado na FCT-UNL no dia 3 de Maio de 2017.



Figura D.1: Poster científico apresentado no *1st Nova Biomedical Engineering Workshop* 2017.